

Aus dem Lehrstuhl für  
Innere Medizin II  
Direktor: Prof. Dr. med. Lars Maier  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen  
Proteinkinase II (CaMKII) auf das diastolische  
SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -  
Konzentration bei Patienten mit Vorhofflimmern**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Katharina Ort

2019



Aus dem Lehrstuhl für  
Innere Medizin II  
Direktor: Prof. Dr. med. Lars Maier  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen  
Proteinkinase II (CaMKII) auf das diastolische  
SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -  
Konzentration bei Patienten mit Vorhofflimmern**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Katharina Ort

2019

**Dekan:** Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  
**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Lars S. Maier  
**II. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt

**Tag der mündlichen Prüfung:** 15.04.2019

# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....  | <b>I</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | <b>V</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....   | <b>VII</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....   | <b>IX</b>  |
| <b>Formelverzeichnis</b> .....   | <b>X</b>   |
| <b>1 Einleitung</b> .....  | <b>1</b>   |
| <b>1.1 Vorhofflimmern</b> .....  | <b>1</b>   |
| <b>1.2 Die Physiologie des Myokards</b> .....  | <b>3</b>   |
| 1.2.1 Die Herzmuskelzelle .....  | 3          |
| 1.2.2 Die elektromechanische Kopplung: Von der Erregung zur Kontraktion .....  | 4          |
| 1.2.3 Die Relaxation .....   | 5          |
| 1.2.4 Besonderheiten des Vorhofmyokards .....  | 6          |
| <b>1.3 Die <math>\text{Ca}^{2+}</math>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)</b> .....                            | <b>7</b>   |
| 1.3.1 Charakteristika der CaMKII .....   | 7          |
| 1.3.2 Aktivierung der CaMKII .....   | 8          |
| 1.3.3 Die Rolle der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung .....   | 9          |
| 1.3.4 Inaktivierung und pharmakologische Hemmung der CaMKII .....  | 11         |
| <b>1.4 Der kardiale Ryanodinrezeptor (RyR2)</b> .....  | <b>14</b>  |
| <b>1.5 Das <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Leck des Sarkoplasmatischen Retikulums und seine Rolle bei Vorhofflimmern</b> ..... | <b>15</b>  |
| <b>1.6 Pathophysiologie des Vorhofflimmerns</b> .....  | <b>17</b>  |
| 1.6.1 Elektrophysiologische Mechanismen und Remodeling .....   | 17         |
| 1.6.2 Kontraktils und strukturelles Remodeling .....   | 18         |
| <b>1.7 Fragestellung der Dissertation</b> .....  | <b>19</b>  |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....   | <b>21</b>  |
| <b>2.1 Gewinnung der Gewebeproben</b> .....  | <b>21</b>  |
| 2.1.1 Probengewinnung von humanem Vorhofmyokard .....  | 21         |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.2 Patientenkollektiv.....   | 22        |
| <b>2.2 Pharmakologische Interventionen .....</b>  | <b>22</b> |
| 2.2.1 CaMKII-Inhibitor KN-93 und das inaktive Analogon KN-92.....   | 22        |
| 2.2.2 Koffein .....   | 22        |
| 2.2.3 Tetracain.....  | 23        |
| <b>2.3 Isolation von Kardiomyozyten aus humanem Vorhofgewebe.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.4 Messung der diastolischen <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Konzentration und des SR <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Gehalts .....</b> | <b>26</b> |
| 2.4.1 Zum Prinzip der Fluoreszenz.....  | 26        |
| 2.4.2 Die Epifluoreszenzmikroskopie.....  | 28        |
| 2.4.3 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM.....   | 29        |
| 2.4.4 Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM.....   | 32        |
| 2.4.5 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.....                                       | 33        |
| 2.4.6 Versuchsprotokoll zur Messung des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts .....  | 34        |
| 2.4.7 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Einfluss von Tetracain .....         | 35        |
| 2.4.8 Auswertung der Epifluoreszenzmessungen.....   | 35        |
| <b>2.5 Messung von <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Sparks mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie .....</b>                      | <b>36</b> |
| 2.5.1 Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie.....  | 37        |
| 2.5.2 Versuchsprotokoll zur Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks .....  | 38        |
| 2.5.3 Versuchsprotokoll zur Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter Tetracain .....  | 39        |
| 2.5.4 Datengenerierung und -auswertung .....  | 39        |
| <b>2.6 Bestimmung der Zelldimensionen .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>2.7 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>2.8 Statistik und Datenauswertung .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>   | <b>42</b> |
| 3.1 Klinische Daten des verwendeten humanen Myokards .....  | 42        |
| 3.2 Einfluss des Herzrhythmus auf die Zelldimensionen .....   | 43        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.3 Untersuchung des Ca<sup>2+</sup>-Lecks des Sarkoplasmatischen Retikulums bei Vorhofflimmern .....</b>  | <b>45</b> |
| 3.3.1 SR Ca <sup>2+</sup> -Leck unter Kontrollbedingungen.....  | 45        |
| 3.3.2 CaMKII-Abhängigkeit des SR Ca <sup>2+</sup> -Lecks .....  | 47        |
| 3.3.3 Weitere Ca <sup>2+</sup> -Spark-Parameter.....  | 51        |
| <b>3.4 Der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums bei Vorhofflimmern .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>3.5 Untersuchung der diastolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des Cytosols bei Vorhofflimmern .....</b>   | <b>53</b> |
| 3.5.1 Diastolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Cytosol unter Kontrollbedingungen ..  | 53        |
| 3.5.2 CaMKII-Abhängigkeit der diastolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration des Cytosols  | 54        |
| <b>3.6 Tetracain-Experimente zur Untersuchung des Einflusses des SR Ca<sup>2+</sup>-Lecks auf die diastolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.....</b> | <b>55</b> |
| 3.6.1 Einfluss von Tetracain auf das SR Ca <sup>2+</sup> -Leck .....  | 56        |
| 3.6.2 Einfluss von Tetracain auf die diastolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....   | 57        |
| <b>3.7 CaMKII-Expression und -Phosphorylierung im humanen atrialen Myokard.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>3.8 Expressionslevel und Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine des Ca<sup>2+</sup>-Haushalts.....</b>                                     | <b>60</b> |
| 3.8.1 Expressionslevel des Ryanodinrezeptors RyR2 .....   | 60        |
| 3.8.2 Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors RyR2 an Ser-2814 und Ser-2808 .....  | 61        |
| 3.8.3 Expression von SERCA2a und Phospholamban .....  | 62        |
| 3.8.4 Phospholamban-Phosphorylierung an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle .....   | 63        |
| <b>4 Diskussion .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>4.1 Das SR Ca<sup>2+</sup>-Leck bei Vorhofflimmern .....</b>   | <b>66</b> |
| <b>4.2 Die Rolle der CaMKII für das SR Ca<sup>2+</sup>-Leck bei Vorhofflimmern .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>4.3 CaMKII-Abhängigkeit des SR Ca<sup>2+</sup>-Lecks von atrialen Kardiomyozyten .....</b>   | <b>71</b> |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 4.4 | Auswirkungen des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks auf die diastolische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration .....                | 72  |
| 4.5 | CaMKII-Abhängigkeit der erhöhten diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern .....               | 73  |
| 4.6 | Das CaMKII-abhängige SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck als potentiell arrhythmogenes Substrat.....                            | 74  |
| 4.7 | Limitationen der Arbeit.....  | 76  |
| 4.8 | Ausblick und klinische Relevanz – CaMKII-Inhibition als mögliche antiarrhythmische Therapie bei Vorhofflimmern? ..... | 77  |
| 5   | Zusammenfassung.....  | 79  |
| 6   | Literaturverzeichnis .....  | 81  |
| 7   | Anhang.....   | 96  |
| 7.1 | Im Rahmen dieser Dissertation verwendete Lösungen.....  | 96  |
| 7.2 | In dieser Dissertation verwendete spezielle Substanzen.....   | 103 |
| 7.3 | Ergänzende Abbildungen zu Kap. 3.3.3 .....  | 104 |



# Abkürzungsverzeichnis

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| AM                                 | Acetoxymethylester   |
| ATPase                             | Adenosintriphosphatase   |
| BAPTA                              | 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid   |
| Ca <sup>2+</sup>                   | Calciumion   |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> | cytosolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentration   |
| CaM                                | Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin   |
| CaMKII                             | Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II  |
| DAD                                | delayed afterdepolarisation, verzögerte Nachdepolarisation   |
| ddH <sub>2</sub> O                 | doppelt destilliertes Wasser   |
| DMSO                               | Dimethylsulfoxid   |
| EAD                                | early afterdepolarisation, frühe Nachdepolarisation  |
| EGTA                               | Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure   |
| F/F <sub>0</sub>                   | Quotient aus systolischer und diastolischer Fluoreszenz  |
| Fluo-3                             | Ca <sup>2+</sup> -Fluoreszenzfarbstoff<br>N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-dichloro-3-oxo-3Hxanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]2-oxyethyl]amino]-5-methylphenoxy]phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxyethyl] |
| Fura-2                             | ratiometrischer Ca <sup>2+</sup> -Fluoreszenzfarbstoff<br>1-(2-(5'-carboxyoxazol-2'yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N,N'- tetraacetic acid, pentapotassium salt                          |
| GAPDH                              | Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase   |
| HEPES                              | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  |
| K <sup>+</sup>                     | Kaliumion  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| KN-92           | inaktives Analogon zu KN-93<br>2-[N-(2-Methoxybenzenesulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methybenzylamin                 |
| KN-93           | aktiver CaMKII-Inhibitor<br>2-[N-(4-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methybenzylamin  |
| MW              | Molekulargewicht   |
| Na <sup>+</sup> | Natriumion   |
| NCX             | Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher   |
| p-Wert          | Signifikanzniveau  |
| pH-Wert         | Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung; negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Aktivität |
| PKA             | Proteinkinase A  |
| PLB             | Phospholamban  |
| RT              | Raumtemperatur   |
| RT 50%          | Zeit bis zur Abnahme der Fluoreszenz um 50%  |
| RyR2            | Ryanodinrezeptor vom kardialen Subtyp  |
| SEM             | Standardfehler des Mittelwerts   |
| Ser             | Serin  |
| SERCA2a         | kardiale sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase  |
| SR              | Sarkoplasmatisches Retikulum   |
| Thr             | Threonin   |

# Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1.1: Schema der elektromechanischen Kopplung .....   | 6  |
| Abb. 1.2: Die $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) .....  | 9  |
| Abb. 1.3: Die regulatorische Funktion der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung .....  | 11 |
| Abb. 1.4: CaMKII-Inhibitor KN-93 und sein inaktives Analogon KN-92 .....  | 12 |
| Abb. 1.5: Modulation des kardialen Ryanodinrezeptors (RyR2) durch Phosphorylierung und das daraus resultierende SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck.....                | 15 |
| Abb. 2.1: Fotografie eines rechten Herzohrs nach Entnahme .....   | 21 |
| Abb. 2.2: Strukturformel von Koffein .....  | 23 |
| Abb. 2.3: Strukturformel von Tetracain .....  | 23 |
| Abb. 2.4: Fotografie des Aufbaus für die Zellisolation .....  | 25 |
| Abb. 2.5: Fotografie eines frisch isolierten rechtsatrialen Kardiomyozyten .....  | 25 |
| Abb. 2.6: Schema des Wirkungsprinzips von Fluoreszenzfarbstoffen am Beispiel von Fluo-3 .....   | 27 |
| Abb. 2.7: Vereinfachtes Schema des Epifluoreszenz-Setups von Ion Optix .....  | 29 |
| Abb. 2.8: Strukturformeln von Fura-2 und Analoga und Fluoreszenzspektrum von Fura-2 in Lösung .....   | 30 |
| Abb. 2.9: Strukturformeln von Fluo-3 und Analoga und Emissionsspektrum von Fluo-3 in Lösung .....   | 32 |
| Abb. 2.10: Beispiel eines $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zur Veranschaulichung der Amplitudenberechnung .....  | 36 |
| Abb. 2.11: Prinzip der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie .....   | 38 |
| Abb. 3.1: Zellhypertrophie von rechtsatrialen Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern verglichen mit Sinusrhythmus .....  | 44 |
| Abb. 3.2: Originalregistrierungen von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks in Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (KN-92) ..... | 45 |
| Abb. 3.3: $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz und Sparkgröße bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (KN-92) .....                         | 46 |
| Abb. 3.4: Totales SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck pro Zelle bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (KN-92) .....                            | 46 |

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 3.5: Anteil der Zellen mit $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen unter Kontrollbedingungen mit KN-92 .....  | 47  |
| Abb. 3.6: Originalregistrierungen von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 im Vergleich zu Kontrollbedingungen (KN-92) illustrieren die Normalisierung des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks in Vorhofflimmern ..... | 48  |
| Abb. 3.7: Signifikante Reduktion der $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz ( $\text{Ca}^{2+}\text{SpF}$ ) durch Inhibition der CaMKII mit KN-93 bei Vorhofflimmern .....  | 48  |
| Abb. 3.8: Die $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkgröße ( $\text{Ca}^{2+}\text{SpS}$ ) verändert sich durch Inhibition der CaMKII mit KN-93 bei Vorhofflimmern nicht .....   | 49  |
| Abb. 3.9: Totales SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck pro Zelle .....   | 50  |
| Abb. 3.10: Anteil der Zellen mit $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen unter Inhibition der CaMKII mit KN-93 .....   | 51  |
| Abb. 3.11: SR $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bei Vorhofflimmern im Vergleich mit Sinusrhythmus .....  | 53  |
| Abb. 3.12: Der diastolische $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Cytosols ist bei Vorhofflimmern erhöht unter Kontrollbedingungen .....   | 54  |
| Abb. 3.13: Normalisierung der cytosolischen diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern durch CaMKII-Inhibition mit KN-93 .....  | 55  |
| Abb. 3.14: Die Hemmung der RyR2 durch Tetracain verhindert das Auftreten von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks .....   | 56  |
| Abb. 3.15: Normalisierung der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol von Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern unter Tetracain verglichen mit Sinusrhythmus .....   | 58  |
| Abb. 3.16: CaMKII-Proteinexpression und -Phosphorylierung in humanem Vorhofmyokard bei Vorhofflimmern verglichen mit Sinusrhythmus .....  | 59  |
| Abb. 3.17: Signifikant verminderte Expressionslevel des RyR2 bei Vorhofflimmern .   | 60  |
| Abb. 3.18: Phosphorylierungsstatus des RyR2 in Abhängigkeit vom Herzrhythmus .  | 62  |
| Abb. 3.19: Unveränderte Expression von PLB und SERCA2a bei Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus .....   | 63  |
| Abb. 3.20: PLB-Phosphorylierung an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Thr-17 bei Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus .....  | 64  |
| Abb. 7.1: Weitere $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Parameter .....   | 104 |

# Tabellenverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 3.1: Wichtige Daten des Patientenkollektivs .....                                    | 43  |
| Tabelle 7.1: St. Thomas Hospital Kardioplegie .....  | 96  |
| Tabelle 7.2: Zur Isolation von humanen Kardiomyozyten benötigte Lösungen .....               | 97  |
| Tabelle 7.3: CaMKII-Inhibitor KN-93 und sein inaktives Analogon KN-92 .....                  | 98  |
| Tabelle 7.4: Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM .....  | 99  |
| Tabelle 7.5: Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM .....  | 100 |
| Tabelle 7.6: Messlösungen für Epifluoreszenz- und konfokale Laserfluoreszenzmessungen .....  | 101 |
| Tabelle 7.7: Kalibrierungslösung für ratiometrische Epifluoreszenzmessungen mit Fura-2 ..... | 102 |
| Tabelle 7.8: Collagen-Lösung zur Zellfixierung auf den Messkammern .....                     | 102 |
| Tabelle 7.9: In dieser Dissertation verwendete spezielle Substanzen .....                    | 103 |

# Formelverzeichnis

|                  |    |
|------------------|----|
| Formel 2.1 ..... | 27 |
| Formel 2.2 ..... | 27 |
| Formel 2.3 ..... | 31 |
| Formel 2.4 ..... | 33 |
| Formel 2.5 ..... | 40 |
| Formel 2.6 ..... | 41 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste Form der behandlungsbedürftigen Herzrhythmusstörungen; nach Studien sind in Europa etwa 4,5 Millionen Menschen betroffen (1), weltweit sogar mehr als 33 Millionen Menschen (2). Die Rhythmusstörung ist charakterisiert durch unkoordinierte, schnelle und unregelmäßige Aktivität der Vorhöfe, welche zum Verlust der Vorhofkontraktion und damit zur Reduktion der kardialen Pumpfunktion führt. Häufig kommt es im Rahmen von Vorhofflimmern zu einer inadäquat schnellen atrioventrikulären Überleitung, so dass eine Tachyarrhythmie entsteht, welche die kardiale Pumpfunktion weiter reduzieren kann. Der Verlust der Vorhofkontraktion bedingt des weiteren eine Verlangsamung des Blutflusses in den Vorhöfen, wodurch das Risiko für die Bildung von Thromben insbesondere im Bereich der Herzohren, kleinen Ausstülpungen der Vorhöfe, und somit für thrombembolische Ereignisse steigt.

Je nach Dauer der Rhythmusstörung wird Vorhofflimmern klinisch in drei Kategorien eingeteilt. Bei paroxysmalem Vorhofflimmern kommt es zur spontanen Terminierung und Rückkehr in den Sinusrhythmus innerhalb weniger Tage. Persistierendes Vorhofflimmern hingegen macht eine medikamentöse oder elektrische Kardioversion zur Wiederherstellung des Sinusrhythmus notwendig. Wenn weder medikamentös noch elektrisch ein andauernder Sinusrhythmus etabliert werden kann, spricht man von permanentem oder chronischem Vorhofflimmern (3, 4).

Die Prävalenz von Vorhofflimmern ist mit dem Alter zunehmend; in der Gruppe der über 40-jährigen sind 2,3% betroffen, bei Menschen über 65 Jahren hingegen schon 5,9% (5). Da jedoch viele Patienten mit Vorhofflimmern asymptomatisch sind, wird sogar eine doppelt so hohe tatsächliche Inzidenz vermutet. Benjamin et al. konnten in einer Datenanalyse basierend auf der Framingham-Studie als unabhängige klinische Risikofaktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern zunehmendes Alter, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, rheumatische sowie nichtrheumatische Herzklappenerkrankungen und Herzinfarkt identifizieren (6). Eine weitere Subgruppenanalyse der Framingham-Studie zeigte, dass Vorhofflimmern unabhängig von weiteren Risikofaktoren mit einem 50-90%igen Anstieg des Sterberisikos verbunden ist (7).

Weitere Risikofaktoren sind Hyperthyreose, Anämie, akute Vagotonie, die Akutphase nach großen Operationen (thorakal, abdominell, Gefäße), Alkoholintoxikation („holiday-heart-syndrome“) sowie verschiedene medikamentöse Intoxikationen. Auch ist bekannt, dass Vorhofflimmern durch andere supraventrikuläre Tachykardien getriggert werden kann (z.B. AV-Knoten-Reentry-Tachykardie) (8). Des weiteren sind heute einige genetische Faktoren bekannt, die eine erhöhte Vulnerabilität für Vorhofflimmern in Abwesenheit der genannten Risikofaktoren bedingen (9-11).

Die klinische Symptomatik bei Vorhofflimmern ist sehr variabel und reicht vom asymptomatischen Patienten ohne hämodynamische Beeinträchtigung über Palpitationen und eine leichte Leistungsbeeinträchtigung bis hin zur hochgradigen hämodynamischen Instabilität mit Angina pectoris, schwerer Hypotonie und pulmonalvenöser Stauung. Laut statistischem Bundesamt ist Vorhofflimmern für 5,4% (6,4% bei Frauen, 4,1% bei Männern) der durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedingten Todesfälle verantwortlich (12). Außerdem birgt Vorhofflimmern durch die Bildung von Vorhofthromben ein hohes Risiko für Embolien und ist die häufigste Ursache für ischämische Schlaganfälle bei über 75-jährigen (13).

Gängige Medikamente zur Rhythmuskontrolle bei Vorhofflimmern sind hauptsächlich Klasse I- und Klasse III-Antiarrhythmika, die nur ungenügend effektiv sind. Camm stellte 2012 fest, dass nur 30-70% der Patienten nach einem Jahr Follow-up noch einen Sinusrhythmus aufwiesen (14). Da die Inzidenz des Vorhofflimmerns in den kommenden Jahren aufgrund der Alterung der Bevölkerung weiter zunehmen wird, ist es umso wichtiger, neue antiarrhythmische Therapieoptionen zu entwickeln. Hierfür ist ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie essentiell.

Diverse Publikationen zeigten in den vergangenen Jahren, dass Vorhofflimmern sowohl zu einem elektrophysiologischen als auch zu einem strukturellen Remodeling des Vorhofmyokards führt, welches die Empfindlichkeit des Myokards für erneute Arrhythmien wiederum erhöht („Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern“). Von zentraler Bedeutung erscheinen hier Fehlregulationen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels und der elektromechanischen Kopplung (15, 16). Gekennzeichnet sind diese durch ein Missverhältnis zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung,  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung im Stoffwechsel der Herzmuskelzelle, worin unterschiedliche Proteine involviert sind. Um diese Zusammenhänge zu veranschaulichen, folgt zunächst eine Einführung in die Physiologie des Myokards. Hiernach werden die Remodeling-Vorgänge bei Vorhofflimmern näher erläutert. Basierend auf den einleitenden Erläuterungen ergibt sich schließlich die



konkrete Fragestellung dieser Dissertation.

### 1.2 Die Physiologie des Myokards

Am Beginn der Einleitung steht die Darstellung der elektromechanischen Kopplung der Herzmuskelzelle, welche den Prozess zwischen elektrischer Erregung über den intrazellulären Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bis hin zur Kontraktion des Kardiomyozyten beschreibt. Die zentrale Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Kontraktionsvorgänge von Muskelzellen wurde bereits 1883 erstmals von Sidney Ringer an isolierten Froschherzen beschrieben (17, 18).

#### 1.2.1 Die Herzmuskelzelle

Das Myokard besteht aus verzweigten, quergestreiften und einkernigen Kardiomyozyten, die ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die einzelne Herzmuskelzelle ist zylindrisch geformt mit einer Länge von ca. 100  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 15-20  $\mu\text{m}$ . Im Netzwerk des Myokards sind die einzelnen Zellen über Disci intercalares (Glanzstreifen) an den Zellenden miteinander verbunden. Diese sorgen für die elektrische und mechanische Kopplung der Zellen untereinander, sodass einerseits die schnelle Erregungsausbreitung über das gesamte Myokard gewährleistet wird und andererseits eine nahezu synchrone Kontraktion des gesamten Zellverbandes (funktionelles Synzytium) entsteht. Die Reizfortleitung von Zelle zu Zelle wird durch sogenannte „gap junctions“ ermöglicht, über die Ionen und second messenger-Moleküle ausgetauscht werden.

Umschlossen ist jede Herzmuskelzelle von einer Zellmembran, in der integrale Proteine verankert sind. Diese Proteine stellen wichtige Ionenkanäle und -pumpen dar, über die Transportvorgänge zur Signalübertragung zwischen intra- und extrazellulärem Raum erfolgen.

Durch fingerförmige Invaginationen, die sogenannten transversalen (T-)Tubuli, wird die Oberfläche des Sarkolemms enorm vergrößert. Im Bereich dieser T-Tubuli steht die

Zellmembran außerdem in enger räumlicher Beziehung zum Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) im Zellinneren. Hier befinden sich L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und Ryanodinrezeptoren, die die elektromechanische Kopplung einleiten (siehe Kap. 1.2.2).

Die Querstreifung des Myokards ergibt sich durch die regelmäßige Anordnung der kontraktilen Filamente der einzelnen Kardiomyozyten, der sogenannten Myofibrillen. Diese sind hintereinander in Form von Sarkomeren angeordnet, wobei ein Sarkomer die kleinste kontraktile Einheit der Herzmuskelzelle darstellt.

Außerdem enthält die Herzmuskelzelle weitere, für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion unerlässliche, Zellorganellen und Proteine wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lipofuszin-Granula, Lysosomen, Peroxisomen, Glykogen sowie das Cytoskelett (19).

### 1.2.2 Die elektromechanische Kopplung: Von der Erregung zur Kontraktion

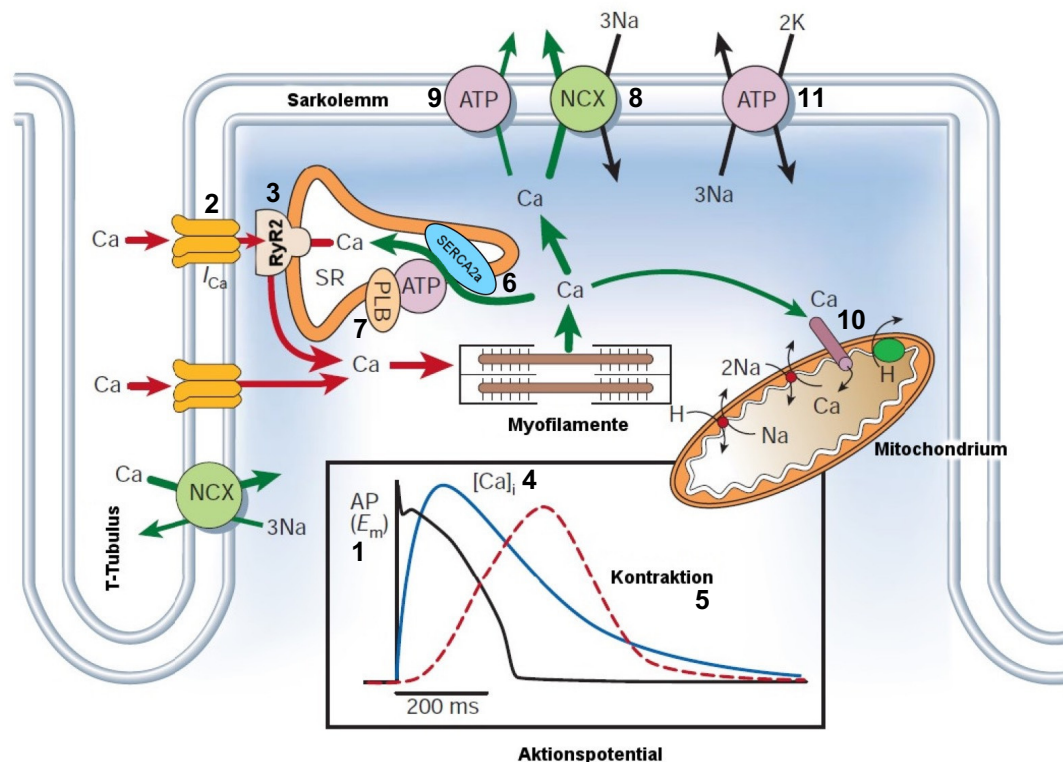
Die Herzmuskelzelle wird durch einen elektrischen Stimulus in Form eines Aktionspotentials erregt (Abb. 1.1, 1). Das Aktionspotential wird entlang der Zellmembran fortgeleitet und führt zur Depolarisation derselben von einem Ruhemembranpotential von -80 mV zu einem positiven Membranpotential von +30 – 50 mV (19). Dieser Aufstrich des Aktionspotentials wird durch das Öffnen schneller  $\text{Na}^+$ -Kanäle erzeugt. Die Depolarisation führt nun zur Öffnung der einwärtsgerichteten, spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren = DHPR) (Abb. 1.1, 2). Hierdurch kommt es zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, welcher wiederum die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch die Ryanodinrezeptoren (RyR2) aus dem SR triggert, welches das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherorganell der Herzmuskelzelle darstellt (Abb. 1.1, 3; (20, 21)). Diese sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (22-24) wird ermöglicht durch die funktionelle und räumliche Organisation von 10 – 25 L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und ungefähr 100 geclusterten RyR2 im Bereich der T-Tubuli und des SR in sogenannten „Couplons“ (25, 26).

Dieser Anstieg der freien cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ~100 nM auf ~1  $\mu\text{M}$  während der Systole (Abb. 1.1, 4) wird dabei hauptsächlich aus der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über die RyR2 generiert (27) und führt zu der bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivierung der Myofilamente, dem sogenannten Querbrückenzyklus, wodurch es zur mechanischen Kontraktion des Kardiomyozyten kommt (Abb. 1.1, 5). Die Repolarisation am Ende des Aktionspotentials erfolgt dagegen hauptsächlich durch auswärtsgerichtete  $\text{K}^+$ -Ströme (19).

### 1.2.3 Die Relaxation

Die Relaxation der Herzmuskelzelle erfordert die Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, damit die Myofilamente relaxieren (Abb. 1.1, grüne Pfeile). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Eliminierung aus dem Cytosol wird hauptsächlich durch vier Transportproteine realisiert (28): die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit der dominanten kardialen Isoform SERCA2a; Abb. 1.1, 6), der sarkolemmale sekundär aktive  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX; Abb. 1.1, 8), die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Abb. 1.1, 9) sowie der mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (Abb. 1.1, 10).

Je nach Spezies variiert der Anteil dieser Transportproteine an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination. In humanen Kardiomyozyten leistet die SERCA2a unter ATP-Verbrauch mit etwa 70% den größten Beitrag zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus dem Cytosol durch Rückaufnahme in das SR, wobei ihre Funktion durch Phospholamban (PLB; Abb. 1.1, 7) im Sinne einer Inhibition moduliert werden kann. Der NCX hingegen transportiert ca. 28% des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol (28). Sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter sind mit einem Anteil von insgesamt 2% folglich nur in sehr geringem Maß an der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination in humanen Herzmuskelzellen beteiligt. Der NCX arbeitet unter physiologischen Bedingungen zumeist im Vorwärtsmodus, was bedeutet, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten des  $\text{Na}^+$  nach extrazellulär transportiert wird (Abb. 1.1, 8). Dieser Modus wird bei intrazellulär hohen  $\text{Ca}^{2+}$ - und niedrigen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen favorisiert, es ist unter besonderen Umständen aber auch eine umgekehrte Flussrichtung (Rückwärtsmodus) möglich. Der elektrochemische Gradient von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  wird durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wiederhergestellt (Abb. 1.1, 11).



**Abbildung 1.1: Schema der elektromechanischen Kopplung**, modifiziert nach Bers 2002, S.198. In Folge eines Aktionspotentials (AP, 1) strömt  $\text{Ca}^{2+}$  über L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $I_{\text{Ca}}$ , 2) in das Cytosol und induziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch die Ryanodinrezeptoren (RyR2, 3) aus dem SR (rote Pfeile). Dieser intrazelluläre Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (4, blaue Kurve im Kasten) bewirkt die Aktivierung der Myofilamente mit nachfolgender Kontraktion der Herzmuskelzelle (5, rote Kurve im Kasten). Im Rahmen der Relaxation wird das cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aus dem Zytosol eliminiert (grüne Pfeile) vornehmlich durch die SERCA2a (6), welche über Phospholamban (PLB, 7) reguliert wird, und den NCX (8) sowie zu geringen Anteilen die sarkomale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (9) und den mitochondrialen Uniporter (10). Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hält die elektrochemischen Gradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  aufrecht (11) (28).

#### 1.2.4 Besonderheiten des Vorhofmyokards

Die meisten der oben beschriebenen Vorgänge basieren auf Untersuchungen an ventrikulären Kardiomyozyten. Im Vergleich zu diesen weisen Vorhofmyozyten einige Besonderheiten auf.

Morphologisch sind atriale Kardiomyozyten dünner und weisen weniger T-Tubuli auf als ventrikuläre Zellen (29, 30). Dies bedingt auch eine kleinere Zelloberfläche und ein kleineres Volumen (31). Durch die besondere Anatomie und die geringere Dichte an

T-Tubuli triggert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Vorhofkardiomyozyten einen nicht-synchronen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels beginnend in der Zellperipherie und fortschreitend in das Zellzentrum (32).

In atrialen Herzmuskelzellen sind die Kontraktions- und Relaxationszeit ebenso kürzer wie die Dauer des Aktionspotentials und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (33-35). Außerdem wird die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten dynamisch reguliert (30). Walden et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in Vorhofmyokardzellen insgesamt höher ist als in Ventrikelmyokardzellen. Des weiteren gibt es signifikante Unterschiede in der Proteinexpression. So ist zum Beispiel die Expression der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a deutlich erhöht, während die Expressionslevel von RyR2 und Phospholamban geringer sind als in ventrikulären Zellen (31, 33). Ebenso findet sich in Vorhofmyokardzellen ein anderes Expressionsmuster bezüglich diverser Ionenkanäle im Vergleich zu Ventrikelzellen (36).

### 1.3 Die $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

#### 1.3.1 Charakteristika der CaMKII

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist eine multifunktionelle Serin/Threonin-Proteinkinase (37). Im Gegensatz zu anderen CaMK-Enzymen handelt es sich bei der CaMKII um ein multimerisches Enzym. Das Holoenzym setzt sich aus 6 – 12 Monomeren (Homo- oder Heteromultimeren) zusammen, die sich wiederum zu einer ringförmigen Struktur gruppieren (Abb. 1.2 B). Jedes CaMKII-Monomer ist aufgebaut aus einer aminoterminalen Domäne mit katalytischer Funktion, einer zentralen regulatorischen Domäne mit einer Autoinhibitions- und einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Bindungsregion, welche sich überlappen, sowie einer carboxyterminalen Assoziationsdomäne, welche für die Oligomerisation des Holoenzym verantwortlich ist (Abb. 1.2 A; (27)).

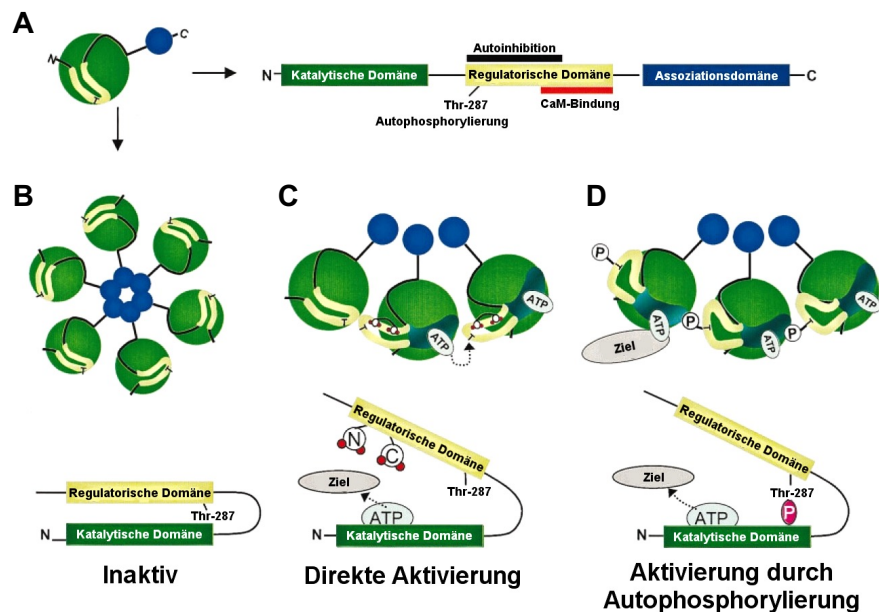
Für die vier bekannten Isoformen der CaMKII kodieren die Gene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Die ubiquitäre CaMKII $\gamma$  und in stärkerem Maße die CaMKII $\delta$  stellen die vorherrschenden Formen in den Kardiomyozyten dar, während CaMKII $\alpha$  und CaMKII $\beta$  vorwiegend in

Zellen des Nervensystems exprimiert werden (27, 38, 39). Im Folgenden wird vorwiegend auf die CaMKII $\delta$  eingegangen, da sie als im Herzen vorherrschende Isoform des Enzyms für diese Arbeit die größte Relevanz hat. Im Herz finden sich zwei Splicevarianten der CaMKII $\delta$  mit jeweils unterschiedlicher Lokalisation (38): Die Splicevariante CaMKII $\delta_B$  ist aufgrund ihrer aus 11 Aminosäuren bestehenden Kernlokalisierungssequenz im Nukleus, die Splicevariante CaMKII $\delta_C$  hingegen im Cytosol der Herzmuskelzelle zu finden (40). Die CaMKII nimmt eine zentrale regulatorische Funktion in der elektromechanischen Kopplung der Herzmuskelzelle ein, scheint aber auch (maladaptive) Genexpressionen bei Herzinsuffizienz und -hypertrophie zu beeinflussen (41, 42).

### 1.3.2 Aktivierung der CaMKII

Ein periodischer Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wie er in der Systole des Herzens stattfindet, bewirkt die Aktivierung der CaMKII, indem vier Ca<sup>2+</sup>-Ionen mit Calmodulin (CaM) einen Komplex bilden und dieser Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex an die zentrale regulatorische Domäne der CaMKII bindet. Durch diese Interaktion wird die autoinhibitorische Domäne verdrängt und die katalytische Domäne freigelegt (Abb. 1.2 C). Neben dieser Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Aktivierung kann die CaMKII darüber hinaus durch Autophosphorylierung im Bereich der autoinhibitorischen Domäne an Threonin-287 (Thr-287) aktiv bleiben (Abb. 1.2 D; (41)). Dieser Mechanismus ist allerdings nicht essentiell für die Aktivität der CaMKII, sondern bewirkt vielmehr eine Affinitätssteigerung des Enzyms für den Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex um das 700-fache (43). Dabei stört die Autophosphorylierung signifikant die Autoinhibition des Enzyms. Daher verfügt die CaMKII im autophosphorylierten Zustand auch nach Absinken der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Diastole und Abdissoziation des Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplexes über 20-80% ihrer Aktivität (44-46).

Diese Mechanismen machen die Aktivierung der CaMKII außerdem stark abhängig von der Herzfrequenz, mit kumulierender Aktivität bei höheren Frequenzen (47).



**Abbildung 1.2: Die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)**, modifiziert nach Maier und Bers 2002, S.924. **A:** Darstellung eines CaMKII-Monomers bestehend aus drei Domänen. **B:** Formierung des CaMKII-Holoenzym aus seinen Monomeren mit den nach außen ragenden katalytischen Domänen. **C:** Direkte Aktivierung der CaMKII durch den Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex (rote Punkte). **D:** Durch Autophosphorylierung der regulatorischen Domäne an Thr-287 kann die CaMKII über einen längeren Zeitraum aktiv bleiben (27).

Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass nicht nur die oben genannten Mechanismen zur Aktivierung der CaMKII führen, sondern auch Oxidation von Methionin-281/282 (Met-281/282) durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (48) sowie Glykosylierung von Serin-279 (Ser-279) durch O-gebundenes N-Acetylglucosamin infolge von erhöhten Glucosespiegeln (49). Gutierrez et al. beschrieben darüber hinaus erstmalig eine Beeinflussung der CaMKII-Aktivität durch Nitrosylierung durch NO (50).

### 1.3.3 Die Rolle der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung

Die CaMKII nimmt eine zentrale regulatorische Funktion in der elektromechanischen Kopplung des Herzens ein, indem sie verschiedene intrazelluläre Proteine phosphoryliert. Hierzu zählen die SERCA2a (51), PLB (52, 53), der RyR2 (54, 55) und Ionenkanäle wie Na<sup>+</sup>- (56), K<sup>+</sup>- (57) sowie L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (58) (Abb. 1.3). Die Phosphorylierung dieser Proteine kann sowohl in einer Hemmung als auch in einer Aktivierung

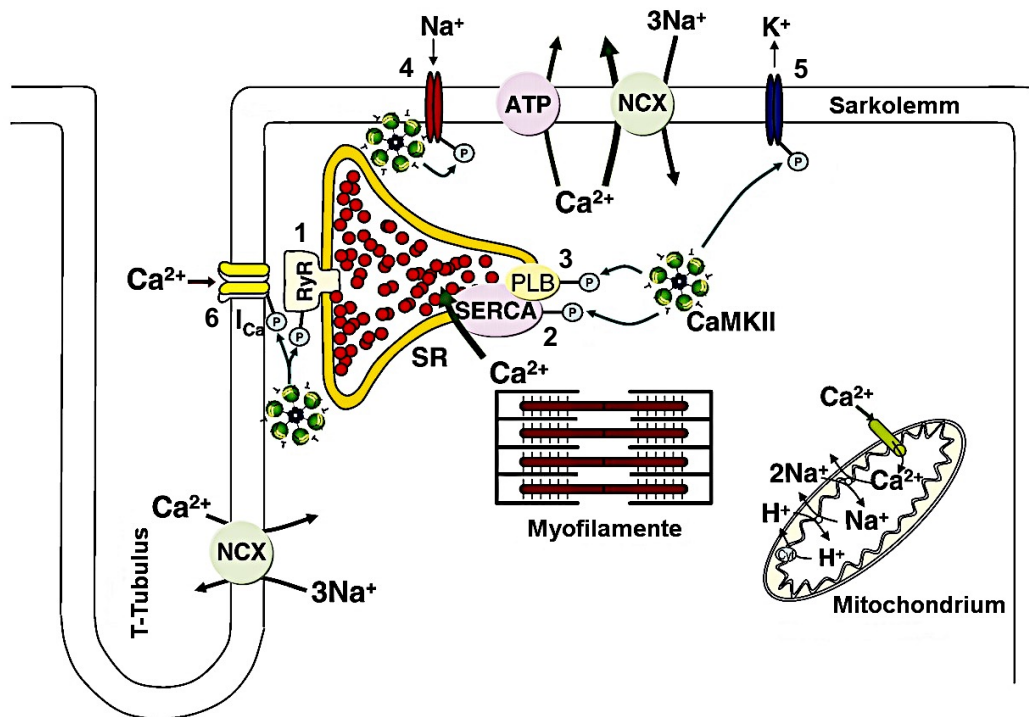
derselben resultieren, wodurch die elektromechanische Kopplung beeinflusst wird. Unter anderem moduliert die CaMKII die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 (Abb. 1.3). Eine CaMKII-spezifische Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure Ser-2814 wurde von Wehrens et al. beschrieben, welche mit einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 in Beziehung gebracht wurde ((59), siehe Kap. 1.4). Währenddessen kann der RyR2 an Ser-2808 sowohl durch die CaMKII als auch durch die PKA phosphoryliert werden (60).

Die Phosphorylierung von PLB an Thr-17 durch die CaMKII führt zur Abdissoziation des PLB von der SERCA2a, wodurch diese nicht mehr dem inhibitorischen Einfluss von PLB unterliegt. Dies führt zur Aktivitätssteigerung der SERCA2a (61). Des Weiteren kann die CaMKII die SERCA2a direkt phosphorylieren, was ebenfalls die Aktivität der SERCA2a erhöht (59, 62). Beides steigert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR.

Die Phosphorylierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch die CaMKII wiederum führt wie bei den RyR2 zur erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle und damit zu einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (58), also einer Steigerung des  $I_{\text{Ca,L}}$ , was wiederum die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR augmentiert (vergleiche Kap. 1.2.2). Auch verschiedene  $\text{Na}^{+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Kanäle werden durch die CaMKII phosphoryliert und hierdurch in ihrer Funktion direkt moduliert. Unter anderem wird hierdurch der späte  $\text{Na}^{+}$ -Strom (late  $I_{\text{Na}}$ ) gesteigert (57, 63).

Insgesamt dekodiert die CaMKII somit durch ihre Wirkungen die Frequenz und Amplitude der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (64).





**Abbildung 1.3: Die regulatorische Funktion der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung,** modifiziert nach Maier und Bers 2007, S.632. Die CaMKII kann durch Phosphorylierung (blaue Pfeile) verschiedene in die elektromechanische Kopplung involvierte Proteine modulieren, z.B. die RyR2 (1), die SERCA2a (2) und PLB (3) sowie  $\text{Na}^+$ - (4)  $\text{K}^+$ - (5) und L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (6). Außerdem dargestellt sind der NCX, mitverantwortlich für die Relaxation und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, welche einen Konzentrationsgradienten aufrechterhält (65).

#### 1.3.4 Inaktivierung und pharmakologische Hemmung der CaMKII

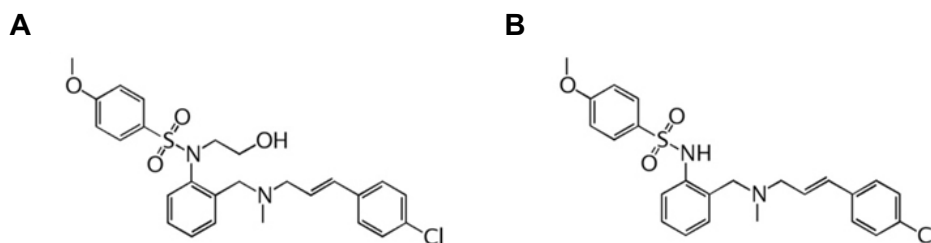
Physiologisch erfolgt die komplette Inaktivierung der CaMKII durch Dephosphorylierung des Enzyms durch die Proteinphosphatasen (PP) PP1, PP2A und PP2C (41).

Pharmakologisch ist eine Hemmung der CaMKII durch mehrere etablierte experimentelle CaMKII-Inhibitoren möglich. Hierzu zählt das Methoxybenzensulfonamin KN-93, welches zur CaMKII-Inhibition in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die wasserlösliche Substanz KN-93 ist ein allosterischer CaMKII-Inhibitor, der kompetitiv mit dem  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex um die Bindungsstelle der regulatorischen Domäne der CaMKII konkurriert, jedoch nicht in Konkurrenz mit ATP steht (66). KN-93 verhindert so die Freilegung von Thr-287 und damit die Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung an Thr-287, jedoch inhibiert KN-93 nicht die bereits autophosphorylierte

und damit aktivierte CaMKII. Dabei besitzt KN-93 eine halbmaximale inhibitorische Potenz von  $K_i=0,37 \mu\text{M}$  (67, 68). Auf andere wichtige „second messenger“-Kaskaden (wie die cAMP-abhängige PKA) hat KN-93 keine relevante Wirkung (68), von einigen Gruppen wurden jedoch inhibitorische Nebeneffekte auf die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und mehrere spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle beschrieben (67, 69-71). Entsprechend sollte bei Arbeiten mit KN-93 (wie in der vorliegenden Arbeit) als Kontrolle die CaMKII-unwirksame Kontrollsubstanz KN-92 verwendet werden, welche die gleichen CaMKII-unabhängigen Nebeneffekte wie KN-93 aufweist (70).

Die Strukturformeln beider Substanzen sind in Abb. 1.4 dargestellt. Entwickelt wurde KN-93 1991 von Hidaka und Kollegen (68).



**Abbildung 1.4: CaMKII-Inhibitor KN-93** (2-[N-(4-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin) **(A)** und sein inaktives Analogon **KN-92** (2-[N-(2-Methoxybenzenesulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin) **(B)**. Modifiziert nach Pellicena und Schulman 2014 (66).

Neben KN-93 gibt es weitere pharmakologische CaMKII-Inhibitoren, welche experimentell in vitro und in vivo genutzt werden. Hier ist zunächst KN-62 zu nennen, das denselben Wirkmechanismus aufweist wie KN-93. Es handelt sich sozusagen um den Vorgänger von KN-93, der ebenfalls von Hidaka und Kollegen entwickelt wurde (72). Weitere etablierte CaMKII-Inhibitoren sind die synthetischen Peptide AIP („Autocamtide-2-related inhibitory peptide“ (73)) und AC3-I („Autocamtide-3 inhibitor“ (74)). Beide hemmen die CaMKII durch kompetitive Bindung an die Substratbindungsstelle, d.h. auch die bereits aktivierte Kinase wird effektiv inhibiert. Limitierender Faktor für den Einsatz dieser Substanzen ist jedoch ihre fehlende Zellmembrangängigkeit, welche durch Myristolierung der Peptide teilweise umgangen werden kann. Allerdings kann dies zu einer verringerten Selektivität des Moleküls führen (66), z.B. wurden für myristolisiertes AIP CaMKII-unabhängige Effekte nachgewiesen (75).

Die bisher beschriebenen CaMKII-Inhibitoren wurden nicht für den therapeutischen

Einsatz konzipiert, sondern dienen rein der experimentellen Erforschung der CaMKII. Diese Forschung, eingeschlossen die hier vorliegende Arbeit, hat wichtige Schlüsselrollen der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung aber auch im Rahmen der Herzinsuffizienz sowie bei Arrhythmien aufgezeigt, sodass die Entwicklung von selektiven CaMKII-Inhibitoren für eine sichere und effektive therapeutische Anwendung bei kardialen Erkrankungen von großem Interesse ist.

Aussichtsreiche Kandidaten sind die neuen niedermolekularen ATP-kompetitiven CaMKII-Inhibitoren SMP-114 (Rimacalib), AS100105 (in der Literatur auch kurz AS105 genannt) und GS-680. Diese Substanzen konkurrieren hochaffin mit ATP um die Bindung an die katalytische Domäne der CaMKII. Das bedeutet, dass die Inhibition der Kinase unabhängig vom Autophosphorylierungsstatus erfolgt und somit die CaMKII sowohl nach  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-induzierter Aktivierung als auch bei autonomer Aktivität nach Autophosphorylierung gehemmt wird.

SMP-114 ist eine oral bioverfügbare Substanz, die initial als krankheitsmodifizierendes Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis entwickelt wurde. Als solches zeigte sie sich aber in einer klinischen Phase II-Studie nach aktuellem Kenntnisstand als nicht effektiv. Von Neef et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass SMP-114 in vitro das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck sowie spontane SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen signifikant reduziert ohne negative Auswirkungen auf die elektromechanische Kopplung, sodass hier die klinische Testung als kardiales Medikament sinnvoll erscheint (76).

AS100105 ist ein Pyrimidin-basierter selektiver CaMKII-Inhibitor, der in vitro mit hoher Effektivität das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck signifikant hemmt, während der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und konsekutiv die Kontraktilität der Kardiomyozyten gesteigert werden (77). Ähnliche Resultate zeigten sich bei Experimenten von Lebek et al. mit GS-680 (78). Für keinen der hier aufgeführten neuen niedermolekularen CaMKII-Inhibitoren wurden bisher Effekte auf andere kardiomyozytäre Kinasen oder Ionenkanäle nachgewiesen.

## 1.4 Der kardiale Ryanodinrezeptor (RyR2)

Der kardiale Ryanodinrezeptor ist der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal des Kardiomyozyten. Bisher konnten drei Isoformen von Ryanodinrezeptoren identifiziert werden, wobei der RyR2 die kardial dominante Isoform darstellt (79). Wie bereits in Kap.1.2.2 erwähnt, ist der RyR2 verantwortlich für die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Cheng et al. beschrieben als erste sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks als die Verkörperung von spontanen elementaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseignissen aus dem SR über geclusterte RyR2 (80, 81).

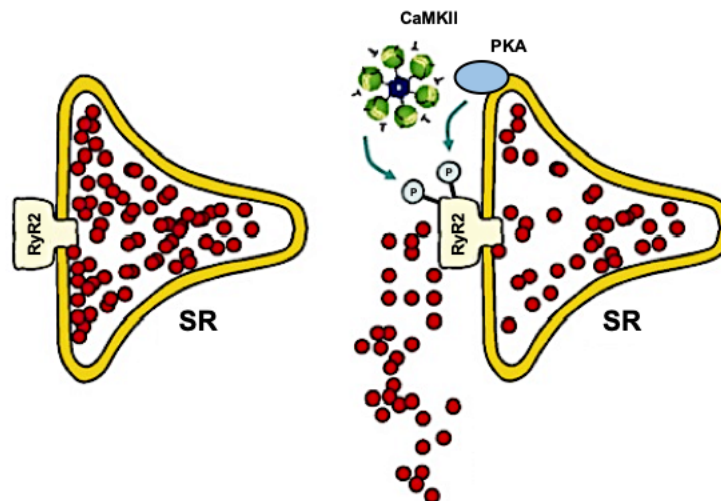
Morphologisch handelt es sich bei dem RyR2 um einen 2200 kDa großen homotetrameren Proteinkomplex mit einer Pore, die zwischen den vier jeweils 565 kDa großen Untereinheiten liegt (26). Die großen N-terminalen cytoplasmatischen Domänen des RyR2 modulieren die Öffnung der Pore und sind am Aufbau eines großen regulatorischen Signalkomplexes beteiligt, in dem sie für diverse regulatorische Proteine als Anker dienen. Zu diesen zählen Calmodulin, Calstabin2 (FK506-Bindeprotein 12.6 = FKBP12.6), ein muskel-spezifisches Ankerprotein für die Proteinkinase A (mAKAP) sowie die Phosphatasen (PP) PP1 und PP2a (19, 26).

Die RyR2 sind in großen Clustern von mehr als 100 einzelnen Kanälen an den Junctionen zwischen SR und Sarkolemm in direkter Nachbarschaft zu L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen angeordnet. Diese Felder stellen große funktionelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskomplexe dar und werden auch Couplons genannt. Wie in Kap.1.2.2 beschrieben, führt eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der cytosolischen Seite des RyR2 zu seiner Aktivierung und damit zur Öffnung der Pore, was zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR führt. Von großer Wichtigkeit ist die Regulation des RyR2 durch Phosphorylierung, dargestellt in Abb. 1.5. Als den RyR2 phosphorylierende Kinasen sind hier insbesondere die Proteinkinase A (PKA) und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) zu nennen. Die PKA phosphoryliert den RyR2 an Ser-2808, was dazu führt, dass die RyR2-Aktivität zunimmt (82, 83).

Die CaMKII hingegen phosphoryliert den RyR2 spezifisch an Ser-2814. Diese Phosphorylierung moduliert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, indem Öffnungswahrscheinlichkeit und Öffnungsdauer des Rezeptors erhöht werden. Des weiteren wird durch Phosphorylierung von Ser-2814 auch die Sensitivität des RyR2 für  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht (55, 59). Die Arbeit von Wehrens et al. konnte außerdem zeigen, dass die CaMKII-

abhängige Phosphorylierung des RyR2 durch hohe Herzfrequenzen gesteigert wird (59). Wie bereits in Kap. 1.3.3 erwähnt, kann der RyR2 darüber hinaus von der CaMKII ebenso wie durch die PKA an Ser-2808 phosphoryliert werden.

Die Dephosphorylierung des RyR2 erfolgt durch die assoziierten Phosphatasen PP1 und PP2a in Abhängigkeit vom Verhältnis der Kinasen- und Phosphatasenaktivität (16, 26).



**Abbildung 1.5: Modulation des kardialen Ryanodinrezeptors RyR2 durch Phosphorylierung und das daraus resultierende SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck, modifiziert nach Maier und Bers 2007, S. 634 (65).**

### 1.5 Das $\text{Ca}^{2+}$ -Leck des Sarkoplasmatischen Retikulums und seine Rolle bei Vorhofflimmern

Unter normalen Bedingungen, also im gesunden Myokard, kommt es nur zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum, wenn ein Aktionspotential zur Öffnung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt, welcher die RyR2 öffnet und  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freisetzt (siehe Kap. 1.2.2). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient führt zur systolischen Kontraktion der Herzmuskelzelle. Während der Diastole jedoch bleiben die RyR2 normalerweise weitgehend geschlossen.

Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks handelt es sich um elementare diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseignisse. Es kommt zu spontanen Öffnungen einzelner Cluster von RyR2 während der

Diastole, wodurch jeweils eine kleine Menge  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytosol freigesetzt wird. Nimmt die Zahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks zu, führt dieses Leck zu einer Verringerung der Beladung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$ , während gleichzeitig die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht wird. Außerdem können  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Waves auslösen, wenn die lokale Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration benachbarte RyR2 aktiviert und sich die spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR wellenförmig fortsetzt. In gesunden humanen Kardiomyozyten sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks sehr seltene Ereignisse (84). Die Häufigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks und damit die Größe des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks ist abhängig von der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung und von der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie dem Phosphorylierungsstatus der RyR2, der deren Öffnungswahrscheinlichkeit moduliert (siehe Abb. 1.5 (84, 85)).

Ein erhöhtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck wiederum führt zu einer erhöhten diastolischen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (im weiteren vereinfachend diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration genannt). Um die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu normalisieren, wird  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX aus der Zelle transportiert, was wiederum zu einem einwärtsgerichteten depolarisierenden Strom führt. Dies kann sogenannte verzögerte Nachdepolarisationen („delayed afterpolarisations“, DAD) auslösen, welche Arrhythmien triggern können (86). Des weiteren können  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks die Aktivität von latenten atrialen Schrittmacherzellen über die o.g. depolarisierenden Mechanismen erhöhen, was ebenfalls Arrhythmien begünstigt (87, 88).

Hove-Madsen et al. konnten zeigen, dass atriale Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern eine höhere Frequenz von spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aufweisen als solche von Patienten ohne Herzrhythmusstörung und damit ein größeres SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck. Dies galt sowohl für  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks als auch für  $\text{Ca}^{2+}$ -Waves. Die Untersuchungsergebnisse legten nahe, dass eine erhöhte Aktivität der RyR2 hierfür verantwortlich ist (15).

Bezüglich dieser Ausführungen muss auch erwähnt werden, dass ein erhöhter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt auch zu einem erhöhten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck führt. Da die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung bei Vorhofmyozyten deutlich höher ist als bei Ventrikelfmyozyten, wie in Kap. 1.2.4 beschrieben, ist in Vorhofmyozyten das Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks von vornherein wahrscheinlicher (32).

## 1.6 Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

In den vergangenen Jahren sind die zellulären und molekularen pathophysiologischen Mechanismen bei Vorhofflimmern intensiv untersucht worden. Hierbei zeigte sich, dass die Herzrhythmusstörung zu einem elektrophysiologischen, kontraktilem und strukturellem Remodeling (also Umbauvorgängen) auf Zellebene führt. Ebenso intensiv werden die Mechanismen erforscht, die Vorhofflimmern initiieren. Hierzu gehören insbesondere ektope Aktivität und Reentry-Mechanismen im Bereich der Vorhöfe.

### 1.6.1 Elektrophysiologische Mechanismen und Remodeling

Aus heutiger Sicht sind Reentry-Mechanismen (d.h. wiedereintretende kreisende Erregungen) und fokale ektope Aktivität die beiden Hauptmechanismen bei der Auslösung von Vorhofflimmern (89-91). Reentry-Kreise können einerseits durch anatomische Hindernisse wie Narben oder generalisierte Fibrose des Myokards entstehen (92), andererseits auch als funktionelles Reentry durch sich vorzeitig an einer refraktären Grenze ausbreitende Impulse. Hier sind insbesondere das Modell des „leading circle“, bei dem ein Reentry in einem Kreis um ein kontinuierlich refraktäres Zentrum auftritt, sowie das „spiral wave“-Modell, bei dem die Erregung um ein Zentrum aus erregbarem jedoch nicht erregtem Gewebe fortschreitet, zu erwähnen (36, 90). Fokale ektope Aktivität wird wahrscheinlich durch frühe Nachdepolarisationen („early afterdepolarisations“, EAD) und verzögerte Nachdepolarisationen („delayed afterdepolarisations“, DAD) ausgelöst. EADs werden durch eine verzögerte Repolarisation der Zellen begünstigt, während DADs wie in Kap. 1.5 beschrieben durch ein erhöhtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks ausgelöst werden (93).

Als erste Arbeitsgruppen konnten Morillo et al. sowie Wijffels et al. 1995 ein tachykardie-induziertes elektrisches Remodeling nachweisen. Tachykardie führt zur Reduktion der Refraktärzeit der atrialen Kardiomyozyten sowie zum Verlust der normalen Frequenzadaptation der Refraktärzeit. Darüber hinaus führt die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern zu einer zunehmenden Empfänglichkeit für das erneute Auftreten von Vorhofflimmern (94, 95). Diese Beobachtung begründete das Konzept „Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern“. Mit Hilfe von Patch Clamp-Techniken konnte nachgewiesen

werden, dass durch Vorhofflimmern insbesondere der Fluss über die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle reduziert wird (96). Jedoch unterliegen auch andere Ionenkanäle den Remodeling-Vorgängen (97, 98). Dass insbesondere auch die RyR2 eine wichtige Rolle spielen, wurde tierexperimentell in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt, die v.a. nach der Durchführung der Experimente der hier vorliegenden Arbeit erschienen sind: In mehreren Tiermodellen konnte eine erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern sowie eine stärkere Persistenz desselben nachgewiesen werden, wenn die Funktion der RyR2 durch Genmutationen im Sinne einer Aktivitätssteigerung verändert wurde (99-102).

### 1.6.2 Kontraktilen und strukturelles Remodeling

Abhängig von der Dauer des Vorhofflimmerns kommt es in den Vorhöfen des Herzens zu einem kontraktilen Remodeling. Nach Kardioversion in den Sinusrhythmus zeigt die atriale Kontraktilität eine deutliche Dysfunktion, deren Erholung mit der Dauer des vorausgehenden Vorhofflimmerns korreliert (103, 104). Dieser atrialen Dysfunktion der Kontraktilität scheinen insbesondere eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen (105, 106) sowie eine Herunterregulierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zugrunde zu liegen (98, 107). Des weiteren kommt es durch den Verlust an Kontraktilität während des Vorhofflimmerns auch zur Dilatation der Vorhöfe (108, 109), welche mit zu den unten beschriebenen ultrastrukturellen Veränderungen beiträgt (110).

Auch in der Ultrastruktur der atrialen Myozyten findet durch Vorhofflimmern ein Remodeling statt. Nach einer gewissen Dauer der Herzrhythmusstörung tritt im Tiermodell eine Dedifferenzierung der Zellen in Richtung eines mehr fetalen Entwicklungsstadiums ein (111, 112). Insbesondere nimmt die Zellgröße zu, was assoziiert ist mit einer perinukleären Akkumulation von Glykogen und Myolyse, also einem Verlust an Sarkomeren, im Zentrum der Zellen. Die strukturellen Veränderungen wurden von Vitadello et al. als physiologische Adaptation an chronische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und metabolischen Stress der Zellen eingeordnet (113). Ähnliche Effekte konnten auch im humanen atrialen Myokard nachgewiesen werden (114). Im Menschen wie auch in vielen Tiermodellen für Vorhofflimmern wurden häufig auch degenerative Veränderungen der Zellen beobachtet zusammen mit einer vermehrten interstitiellen Fibrose sowie einer Dilatation der Vorhöfe (115-117).

Die beschriebenen Veränderungen durch Vorhofflimmern sind nach Konversion in den



Sinusrhythmus größtenteils umkehrbar. So konnte in humanem Myokard gezeigt werden, dass nach lang andauerndem Vorhofflimmern das elektrophysiologische Remodeling der Zellen innerhalb weniger Tage reversibel war (118, 119). Hingegen benötigt es in Abhängigkeit von der Dauer des vorangehenden Vorhofflimmerns einen wesentlich längeren Zeitraum (bis zu Monaten), bis sich die strukturellen Veränderungen zurückgebildet haben (104, 120).

### 1.7 Fragestellung der Dissertation

Aufgrund der klinischen Bedeutung des Vorhofflimmerns ist ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse bei Vorhofflimmern nicht nur grundlagenwissenschaftlich interessant, sondern auch wichtig zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze für diese Erkrankung. Zwar existieren zum Zeitpunkt der hier dargelegten Experimente einige tierexperimentelle Studien und einige wenige Untersuchungen an humanem Vorhofmyokard, jedoch sind die Mechanismen des vermuteten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks bei Vorhofflimmern unzureichend verstanden. Sowohl die Rolle der CaMKII bei der Entstehung von Vorhofflimmern, als auch ihre genauen Regulationsmechanismen werden aktuell kontrovers diskutiert.

Zentrale Hypothese meiner Arbeit ist, dass bei Vorhofflimmern eine Überexpression der CaMKII vorliegt und es CaMKII-abhängig zu einem erhöhten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck kommt (z.B. durch Hyperphosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814) mit der Folge eines pro-arrhythmischen Anstiegs der diastolischen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und dass diese Veränderungen entsprechend durch CaMKII-Inhibition reversibel bzw. in der klinischen Perspektive therapierbar sind.

Entsprechend wurden folgende konkrete Fragenstellungen in diesem Zusammenhang gestellt:

1. Lässt sich die vermutete vermehrte CaMKII-Expression und vermehrte CaMKII-abhängige RyR2-Phosphorylierung in den untersuchten Myokardproben bestätigen?
2. Führt diese RyR2-Hyperphosphorylierung zu einem vermehrten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck?
3. Hat dieses Leck Auswirkungen auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration?
4. Sind diese Effekte tatsächlich CaMKII-abhängig bzw. lassen sie sich durch CaMKII-Inhibition abschwächen?

## **2 Material und Methoden**

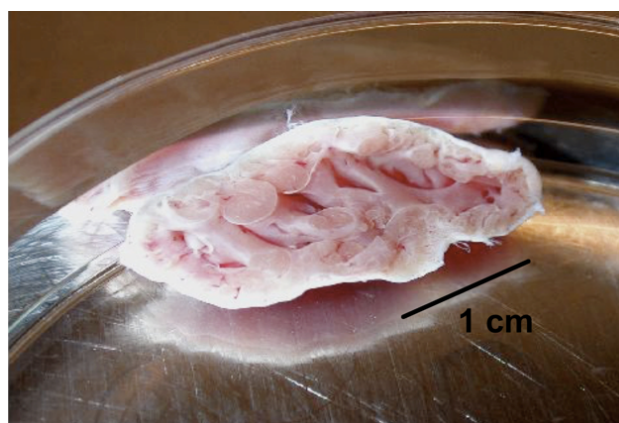
### **2.1 Gewinnung der Gewebeproben**

#### **2.1.1 Probengewinnung von humanem Vorhofmyokard**

In der vorliegenden Dissertation wurden Kardiomyozyten aus humanem Vorhofgewebe verwendet. Hierzu wurde bei Patienten, die sich einer Bypass-, Herzklappen- oder einer anderen Herzoperation unterziehen mussten, ein Stück des rechten Herzhohrs, einem Anhängsel des rechten Vorhofs, entnommen (Abb. 2.1). Die Entnahme geschah direkt vor Anschluss des Patienten an die Herz-Lungen-Maschine. Aus operationstechnischen Gründen wurde bei dem jeweiligen Eingriff hierfür ohnehin die Spitze des rechtsatrialen Herzhohrs reseziert, um hierüber die venöse Kanüle der Herz-Lungen-Maschine einzuführen, so dass den Patienten durch die Probenentnahme kein Schaden zugefügt wurde.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das gewonnene Gewebe für den Transport in St. Thomas Hospital Kardioplegie-Lösung überführt und auf Eis gekühlt.

Alle Probenentnahmen geschahen mit der Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (Ethikantrag 21/10/00) und dem schriftlichen Einverständnis des jeweiligen Patienten.



**Abbildung 2.1: Fotografie eines rechten Herzhohrs nach Entnahme.**

### 2.1.2 Patientenkollektiv

Es wurden Myokardproben von Patienten mit direkt präoperativ elektrokardiographisch dokumentiertem Vorhofflimmern im Vergleich mit Proben von Patienten mit Sinusrhythmus untersucht. Alle Arbeitsschritte erfolgten pseudonymisiert. Die wesentlichen klinischen Charakteristika der Patienten einschließlich ihrer Medikation sowie die Art der durchgeführten Operation wurden dokumentiert und die beiden Gruppen so gut wie möglich „gematcht“. Die entsprechende statistische Auswertung der Patientendaten findet sich im Ergebnis-Teil der vorliegenden Arbeit in Kap. 3.1.

## 2.2 Pharmakologische Interventionen

### 2.2.1 CaMKII-Inhibitor KN-93 und das inaktive Analogon KN-92

In der vorliegenden Dissertation kam der CaMKII-Inhibitor KN-93 (Merck Calbiochem®) zum Einsatz. Als etablierte Kontrollsubstanz für KN-93 wurde sein inaktives Analogon KN-92 (Merck Calbiochem®) verwendet. Die Strukturformeln beider Substanzen sind in Abb. 1.4 dargestellt.

In den Experimenten wurden beide Substanzen in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  verwendet.

### 2.2.2 Koffein

Koffein führt zu einer reversiblen kompletten Öffnung der RyR2, was zur Freisetzung des gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts aus dem SR in das Cytosol führt. Das Ausmaß dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung kann mittels eines im Cytosol befindlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoffs gemessen werden und somit über die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt abgeschätzt werden.

Die Strukturformel von Koffein findet sich in Abb. 2.2.

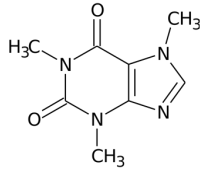


Abbildung 2.2: Strukturformel von Koffein (121).

### 2.2.3 Tetracain

Um zu prüfen, ob die vermutete erhöhte distolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration tatsächlich auf einer erhöhten Frequenz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks beruht und damit auf einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2, wurde Tetracain verwendet. Hierbei handelt es sich um einen bekannten Inhibitor des RyR2, der reversibel für den kompletten Verschluss des Rezeptors sorgt und so einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Austritt aus dem SR ins Cytosol über die RyR2 verhindert (122).

In Abb. 2.3 ist die Strukturformel von Tetracain dargestellt.

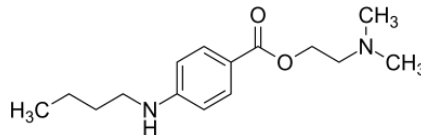


Abbildung 2.3: Strukturformel von Tetracain (123).

## 2.3 Isolation von Kardiomyozyten aus humanem Vorhofgewebe

Zur Isolation der Kardiomyozyten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der „Chunk Isolation“, also des enzymatischen Verdaus von Gewebestücken, verwendet. Die Gewebeproben wurden aus der Transportlösung entnommen und zunächst mehrfach mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung gespült, um das enthaltene  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Gewebe zu spülen und möglicherweise noch vorhandene Blutreste zu entfernen, um auf diese Weise eine Kontamination der späteren Zellsuspension mit Erythrozyten zu vermeiden. Nun wurde die jeweilige Gewebeprobe in eine mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung gefüllte

Präparationsschale verbracht. Daraufhin wurden unter einem binokularen Mikroskop mithilfe von Splitterpinzette und feiner Präparationsschere Epikard, Bindegewebe und Fett vorsichtig von der Probe entfernt, so dass nur Vorhofmyokard erhalten blieb. Dieses wurde anschließend in ca. 1 mm große Stücke geschnitten. Hierbei wurde strikt darauf geachtet, dass das Myokard nicht gedehnt wurde.

Im Rahmen der Präparation wurden ebenfalls Gewebeproben für spätere Western Blot-Analysen entnommen (s. Kap. 2.7), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nun wurden die Gewebestücke in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und in diesem zweimal mit jeweils 10 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung erneut gewaschen. Dabei wurde das Pellet jeweils absinken gelassen und der Überstand verworfen.

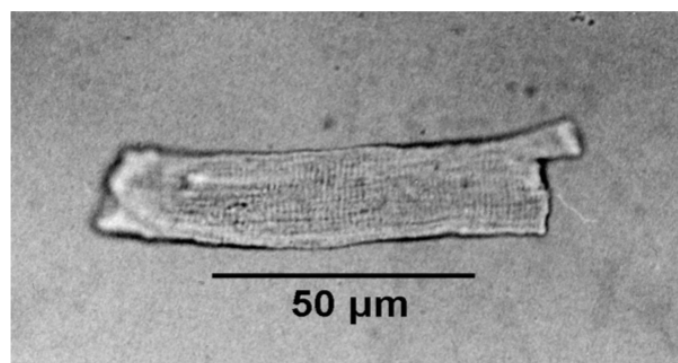
Im nun folgenden Zellisolationsvorgang wurden die Gewebestücke in einer Isolationsflasche gefüllt mit einer Enzymlösung bei 36°C inkubiert (Abb. 2.4). Diese Lösung bestand aus  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung versetzt mit 2 mg/ml Collagenase (Worthington Typ 2, 290 U/mg) und 50 µg/ml Proteinase (Sigma Typ XXIV, 9 U/mg). Das Gemisch wurde bei permanenter Sauerstoffzufuhr (Begasung durch kontinuierlichen Blasenstrom über eine in das Bad getauchte Kanüle) durch Rotation in Bewegung gehalten. Nach 45 min wurde der Überstand der Lösung verworfen und das verbleibende Gewebe wurde in einem zweiten Verdauungsschritt in frischer  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung mit 1,8 mg/ml Collagenase und 50 µg/ml Proteinase weiter verdaut. Nach 20 bis 30 min wurde der Überstand jeweils abgenommen und durch frische Enzymlösung ersetzt. Der Überstand wurde jeweils für 3 min zentrifugiert, um die herausgelösten Zellen abzutrennen. Das abzentrifugierte Zell-Pellet wurde anschließend in KB-Medium gelöst und bei Raumtemperatur (23°C, pH 7,4) für eine Stunde inkubiert. Diese Prozedur wurde vier- bis sechsmal wiederholt, bis ausreichend Kardiomyozyten für die folgenden Versuche gewonnen werden konnten.



**Abbildung 2.4: Fotografie des Aufbaus für die Zellisolation.**

Nach Abschluss des Isolationsvorgangs wurde die Zellsuspension für die folgenden Versuche in spezielle mit Collagen beschichtete Messkammern gegeben und für ca. 1 Stunde ruhen gelassen. Außerdem wurde je nach folgendem Experiment eine Farbstofflösung (Fluo-3 AM oder Fura-2 AM) und gegebenenfalls der CaMKII-Inhibitor KN-93 bzw. sein inaktives Analogon KN-92 hinzugegeben. Hieraufhin wurden die Zellen erneut bei Raumtemperatur für 20 – 30 min lichtgeschützt inkubiert, um eine ausreichende Anhaftung der Zellen an der Messkammer und eine ausreichende Beladung mit Farbstoff sowie KN-93 bzw. KN-92 zu erzielen.

Um eine hohe Qualität der folgenden Messungen zu gewährleisten, wurden ausschließlich gestreckte, rechteckige Zellen mit klar erkennbarer Querstreifung und wenigen Granulationen ausgewählt (Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5: Fotografie eines frisch isolierten rechtsatrialen Kardiomyozyten.**

### 2.4 Messung der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts

Die Untersuchungen der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wurden mit einem invertierten Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt. Zur Durchführung der Messungen wurde ein Epifluoreszenz-Setup der Firma Ion Optix (Milton / USA) an einem invertierten Mikroskop (Nikon Eclipse TE200-U, Nikon, Tokio / Japan) verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei den epifluoreszenzmikroskopischen Messungen Fura-2 AM und Fluo-3 AM eingesetzt.

Zum besseren Verständnis der Experimente soll hier zunächst auf das Prinzip der Fluoreszenz eingegangen werden, bevor Epifluoreszenzmikroskopie und Farbstoffe näher erläutert werden.

#### 2.4.1 Zum Prinzip der Fluoreszenz

Fluoreszenz beschreibt das Verhalten von Molekülen mit bestimmten Eigenschaften, wie z.B. die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, wenn diese mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt werden (Exzitationslicht). Diese Absorption von kurzwelligem (energiereicherem) Licht führt zur anschließenden Emission von längerwelligem (energieärmerem) Licht (Emissionslicht) (siehe Abb. 2.6).

Eine hierfür bedeutende strukturelle Eigenschaft vieler Fluoreszenzfarbstoffe ist, dass sie mehrere aromatische Ringstrukturen mit delokalisierten Elektronen beinhalten, so dass sie leicht mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung treten können. Werden die Photonen des Anregungslichts absorbiert, gelangen die Elektronen der fluoreszierenden Moleküle auf ein höheres Energieniveau. Da dieses höhere Niveau jedoch instabil ist und Moleküle stets einen stabileren niederenergetischen Zustand anstreben, fallen die Elektronen entsprechend schnell auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Die mittlere Verweildauer im höherenergetischen Zustand wird auch „Fluoreszenz-Lebenszeit“ genannt und liegt bei den meisten fluoreszierenden Molekülen im Bereich von einigen Nanosekunden (ca. 10 ns). Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau kommt es zur Emission von Energie  $\Delta E$  (Formel 2.2) in Form von Licht, welches jedoch energieärmer und somit von größerer Wellenlänge ist als das



Exzitationslicht, da ein Teil der ursprünglichen Energie zuvor als thermische und Vibrationsenergie abgegeben wurde. Diese Differenz zwischen Exzitations- ( $\lambda_{ex}$ ) und Emissionswellenlänge ( $\lambda_{em}$ ) von 20-50 nm wird als Stokes-Shift bezeichnet (Formel 2.1; (124)).

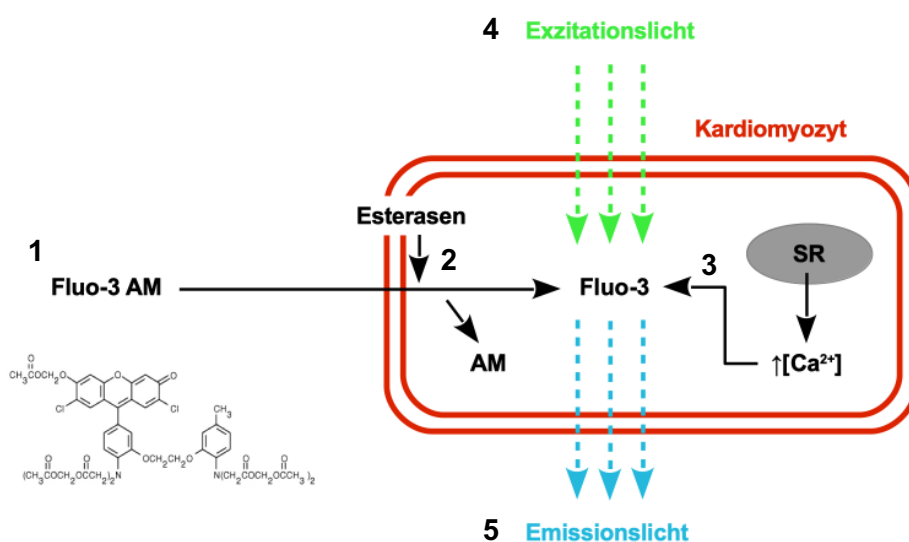
**Stokes-Shift:**  $\lambda_s = [\lambda_{ex} - \lambda_{em}]$

Formel 2.1

**Energiedifferenz:**  $\Delta E = h \cdot c \cdot \left( \frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \right)$

Formel 2.2

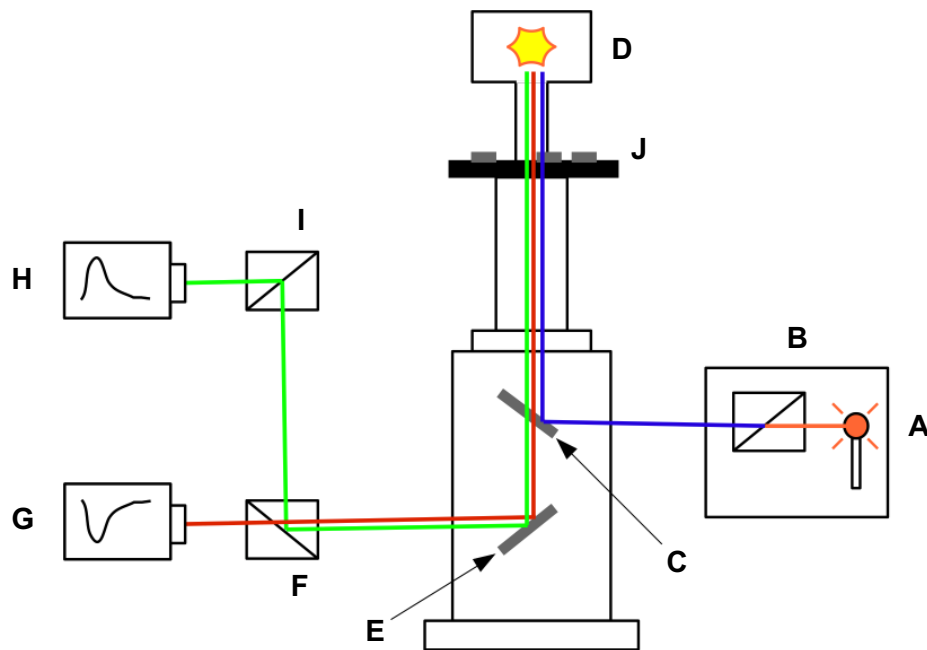
|                |                                      |     |  |
|----------------|--------------------------------------|-----|--|
| $\lambda_s$    | Wellenlängenverschiebung nach Stokes | $c$ | Planck'sches Wirkungsquantum<br>$6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ |
| $\lambda_{ex}$ | Exzitationswellenlänge               | $h$ | Lichtgeschwindigkeit   |
| $\lambda_{em}$ | Emissionswellenlänge                 |     |  |
| $\Delta E$     | Energiedifferenz                     |     |  |



**Abbildung 2.6:** Schema des Wirkungsprinzips von Fluoreszenzfarbstoffen am Beispiel von Fluo-3.

### 2.4.2 Die Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie ist eine Sonderform der Mikroskopie, bei der Fluoreszenzfarbstoffe genutzt werden. Der Grundaufbau eines Epifluoreszenzmikroskops entspricht einem Lichtmikroskop, jedoch dient als Lichtquelle eine Lampe mit sehr hoher Leuchtstärke, im Falle der hier durchgeführten Experimente eine Xenon-Lampe (Xenon short arc lamp Typ UXL-75XE von Ushio Inc., Tokio / Japan). Mittels eines Anregungsfilters wird nur derjenige Anteil des erzeugten Lichts hindurchgelassen, der die den Farbstoff anregenden Wellenlängen enthält. Das gefilterte, kurzwellige Licht wird von einem dichroitischen Spiegel im Inneren des Mikroskops auf das Untersuchungsobjekt reflektiert. Dichroitische Spiegel besitzen eine sogenannte kritische Wellenlänge, was bedeutet, dass Licht mit kleineren Wellenlängen, z.B. das Anregungslicht, reflektiert wird, während Licht mit größeren Wellenlängen, z.B. die emittierte Fluoreszenz, durchgelassen wird. Die kritische Wellenlänge des Spiegels wird also entsprechend zwischen der Wellenlänge der Absorptions- und Emissionsmaxima des verwendeten Farbstoffs gewählt, so dass das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt wird, während das Fluoreszenzlicht den Spiegel passieren kann und zu einem das Fluoreszenzsignal verstärkenden Photomultiplier geleitet wird. Hier wird das Signal verstärkt und in Spannung umgewandelt sowie vom Fluoreszenz-System-Interface in digitale Daten konvertiert und im Programm Ion Wizard dargestellt und aufgezeichnet. Ein vereinfachtes Schema des Setups ist in Abb. 2.7 dargestellt.

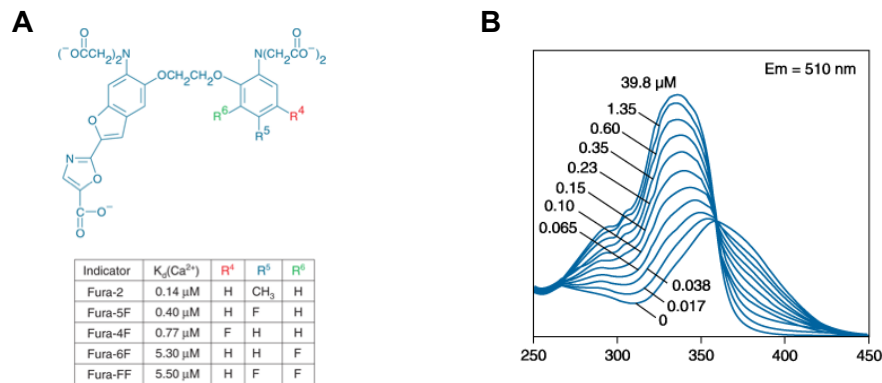


**Abbildung 2.7: Vereinfachtes Schema des Epifluoreszenz-Setups von Ion Optix.** Das Licht der Xenonlampe (A) passiert einen Anregungsfilter (B), der das Licht mit für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs benötigten Wellenlänge passieren lässt (blaue Linie). Über einen dichroitischen Spiegel mit der entsprechenden kritischen Wellenlänge (C) wird das kurzwellige Anregungslicht auf das Präparat (J) gelenkt, während das vom Präparat emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht (grün) sowie das Durchlicht (D, rot) durchgelassen werden. Über einen weiteren dichroitischen Spiegel (F) sowie mehrere einfache Spiegel (E, I) werden das Fluoreszenzlicht einem Photomultiplier (H) und das Durchlicht der Myozytenkamera (G), welche Fotos der untersuchten Zellen ermöglicht, zugeleitet. Modifizierte Abbildung nach der Ion Optix-Homepage (125).

### 2.4.3 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Bei Fura-2 AM handelt es sich wie bei den meisten Fluoreszenzfarbstoffen um einen Chelatbildner. Chelatoren bilden mit freien Ionen Chelatkomplexe, im Falle von Fura-2 werden Komplexe mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebildet. Die Chelatkomplexe liefern Fluoreszenzsignale, die sich deutlich vom Fluoreszenzsignal des freien Farbstoffs unterscheiden und vor allem deutlich über der Eigenfluoreszenz von Zellen liegen. Dies rührt daher, dass durch die Komplexbildung mit  $\text{Ca}^{2+}$  die Eigenschaften von Fura-2 qualitativ und quantitativ verändert werden; hierzu zählen Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge und Emissionsintensität.

Fura-2 wurde von Tsien und Mitarbeitern als ein Derivat von BAPTA (1,2-Bis(2-amino-phenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) entwickelt ((126), Abb. 2.8 A). Die Dissoziationskonstante von Fura-2 ( $K_d$ ) in Kardiomyozyten liegt bei 312 nmol/L (127).



**Abbildung 2.8: Strukturformeln von Fura-2 und Analoga (A) und Fluoreszenzspektrum von Fura-2 in Lösung (B).** Auf der X-Achse des Diagramms (B) ist die Wellenlänge in nm aufgetragen. Die Zahlen an den Kurven geben die jeweilige freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in  $\mu\text{M}$  an. Es ist das Immissionsspektrum von Fura-2 dargestellt, die Y-Achse zeigt die Intensität der Immission, die Emission erfolgt bei 510 nm. Modifiziert nach der Online-Version des „The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies“ 10. Auflage von Molecular Probes (128).

Fura-2 und viele andere Fluoreszenzfarbstoffe sind in ihrer freien Form aufgrund ihrer polaren Eigenschaften membranimpermeabel. Um eine Beladung von Zellen mit Farbstoffen zu ermöglichen, werden diese verestert, im Falle von Fura-2 als Azetoxymethylester (AM) (siehe Abb. 2.8). Diese Ester können dank ihrer lipophilen Eigenschaften per Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten durch die Zellmembran in die Zelle gelangen, wo die Freisetzung des Farbstoffs durch cytosolische Esterasen unter Abspaltung des Azetoxymethylrestes erfolgt. Nun kann der freigesetzte Farbstoff freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden, ist aber nicht in der Lage, die Zelle zu verlassen oder durch Lipiddoppelschichten aus dem Cytosol weiter in andere Zellkompartimente (wie z.B. das SR) zu permeieren.

Bei Fura-2 handelt es sich um einen ratiometrischen Farbstoff. Dies bedeutet, dass mit diesem Farbstoff eine quantitative Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration möglich ist. Bei ratiometrischen Farbstoffen kommt es durch Ionenbindung zu einer Verschiebung der Absorptions- oder Emissionsmaxima im kurzwelligen Bereich, dies wird als „Spektralshift“ bezeichnet. Bei Fura-2 verschiebt sich das Absorptionsmaximum mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei unverändertem Emissionsmaximum

bei 510 nm (Abb. 2.8 B). Im Schnittpunkt der Kurvenscharen ist die Fluoreszenz unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (isobestischer Punkt).

Diese Eigenschaften machen quantitative Aussagen über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration möglich, da die unterschiedlichen Absorptionsmaxima in einem festen Verhältnis (= Ratio) stehen. In der folgenden Formel wurde der Zusammenhang zwischen den ermittelten Ratiowerten und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Grynkiewicz erstmals beschrieben (129):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot \left( \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \cdot \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad \text{Formel 2.3}$$

|            |  |
|------------|--|
| $R$        | berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (z.B. bei $\lambda_{\text{Ex}} = 340/380 \text{ nm}$ )                 |
| $R_{\min}$ | Ratiowert der Fluoreszenzintensität im „ $\text{Ca}^{2+}$ -freien“ Eichpräparat ( $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-9} \text{ M}$ )           |
| $R_{\max}$ | Ratiowert der Fluoreszenzintensität im „ $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten“ Eichpräparat ( $[\text{Ca}^{2+}] \geq 10^{-4} \text{ M}$ )   |
| $K_d$      | Dissoziationskonstante der Reaktion zwischen $\text{Ca}^{2+}$ und ratiometrischem Farbstoff  |
| $S_{f2}$   | Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im „ $\text{Ca}^{2+}$ -freien“ Eichpräparat      |
| $S_{b2}$   | Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im „ $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten“ Eichpräparat |

Bei dem Quotienten  $\frac{S_{f2}}{S_{b2}}$  handelt es sich um einen Korrekturfaktor zur Berücksichtigung der Einflüsse von Geräteparametern und Versuchsbedingungen auf den Fluoreszenzfarbstoff (130). Auch  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  werden für die jeweilige Versuchsanlage experimentell bestimmt (131). So sind die Messwerte auch relativ unabhängig von der Konzentration des Farbstoffs, dem Farbstoffverlust, dem Ausbleichen des Farbstoffs sowie der Objektdicke und von eventuellen Schwankungen in der Intensität der Anregungswellenlänge.

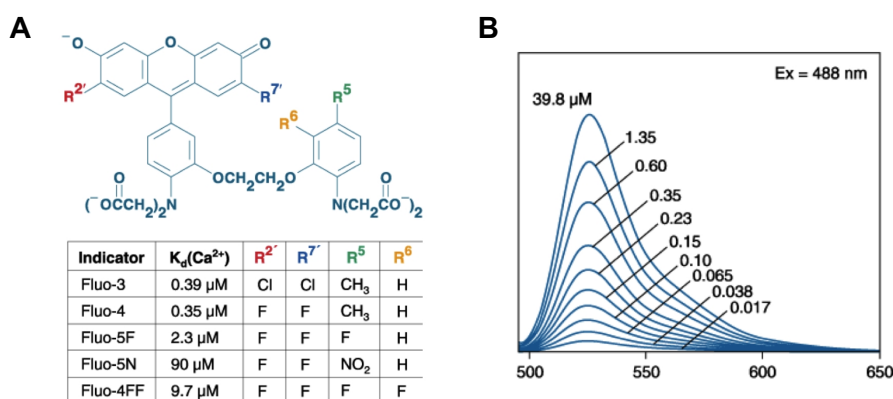
Da Fura-2 bereits in geringen Konzentrationen (10-50  $\mu\text{mol/L}$ ) Fluoreszenzsignale liefert, sind Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im nanomolaren Bereich möglich. Die obere Grenze für messbare Konzentrationsunterschiede liegt bei ca.  $10^{-4} \text{ mol/L}$ . Bedingt durch die Kinetik von Fura-2 beträgt die maximale zeitliche Auflösung einer Messung ca. 5 ms (132).

## 2.4.4 Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM

Wie auch bei Fura-2 handelt es sich bei Fluo-3 um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindenden Chelatbildner. Wie in Kap. 2.4.3 bereits für Fura-2 beschrieben, muss auch Fluo-3 verestert sein, um Zellen permeieren zu können (siehe Abb. 2.9). In dieser Arbeit wurde auch hier die Form des Azetoxymethylesters genutzt (Fluo-3 AM, Invitrogen, Carlsbad / USA).

Fluo-3 wurde von Minta und Mitarbeitern vor allem für den Einsatz bei der Laserscanning-Konfokalmikroskopie entwickelt (133). Das Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei ca. 525 nm. Dies bedeutet, dass Fluo-3 optimal durch einen Argon-Laser zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung besitzt Fluo-3 keine messbare Fluoreszenz. Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) liegt bei 390 nmol/L. Strukturformel und Emissionsspektrum sind in Abb. 2.9 dargestellt.

Im Gegensatz zu Fura-2 handelt es sich bei Fluo-3 um einen nicht-ratiometrischen Farbstoff; das heißt, er ist nicht zur Messung absoluter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen geeignet. Vorteilhaft ist hier das günstigere Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen, so dass Fluo-3 auch im Rahmen von Messungen mit sehr niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplituden, wie z.B. bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks, eingesetzt werden kann. Insgesamt sind jedoch zunächst nur qualitative Aussagen über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt möglich.



**Abbildung 2.9: Strukturformeln von Fluo-3 und Analoga (A) und Emissionsspektrum (B) von Fluo-3 in Lösung.** Auf der X-Achse des Diagramms (B) ist die Emissionswellenlänge in nm aufgetragen und die Y-Achse zeigt die Intensität der Emission, die Anregung erfolgt bei 488 nm. Die Zahlen im Diagramm geben die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in  $\mu\text{M}$  an. Modifiziert nach der Online-Version des „The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“ 10. Auflage von Molecular Probes (128).

Um trotzdem aus den gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplituden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnen zu können, ist es notwendig, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle bereits zu kennen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden dazu die mit Fura-2 gemessenen ratiometrischen Werte zugrunde gelegt, die sich jeweils auf dieselben Zellen beziehen. In den Messungen mit Fluo-3 wurde die  $F/F_0$  ermittelt, die das relative Verhältnis von Peakfluoreszenz zu Hintergrundfluoreszenz darstellt. Wird nun auch die Dissoziationskonstante  $K_d$  des Farbstoffs Fluo-3 mit einbezogen, ergibt sich analog zur Formel nach Grynkiewicz folgende Formel:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{SR} = K_d \cdot \frac{\frac{F}{F_0}}{\left(\frac{K_d}{[\text{Ca}^{2+}]_{cyt}} + 1 - \frac{F}{F_0}\right)} \quad \text{Formel 2.4}$$

### 2.4.5 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

200-500  $\mu\text{L}$  Zellsuspension frisch isolierter rechtsatrialer Kardiomyozyten wurden auf eine mit Collagen beschichtete Versuchskammer aufgebracht, wobei die Menge der Zellsuspension abhängig war von der Zelldichte darin. Hierzu wurde die jeweilige Versuchskammer mit 5  $\mu\text{L}$  Collagen-Lösung bestrichen und anschließend die Zellsuspension auf die noch flüssige Collagen-Schicht gegeben. Nach Adhärenz der Zellen an das Collagen nach ca. einer Stunde wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und die Zellen mit Farbstofflösung mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Fura-2 AM lichtgeschützt inkubiert (20 min bei RT). Zur pharmakologischen Intervention war die Farbstofflösung mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 oder dem inaktiven Analogon KN-92 versetzt (jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$ ; vgl. Kap. 2.2.1). Nach Ende der Inkubationszeit und Montage der Versuchskammer auf den Objektisch des Epifluoreszenzmikroskops wurde die Kammer für 5 min mit Messlösung gespült, um überschüssigen, extrazellulären Farbstoff und Zelldetritus zu entfernen. Auch während der Experimente wurde die Kammer kontinuierlich bei RT mit Messlösung perfundiert, welche entsprechend mit 1  $\mu\text{mol/L}$  KN-93 bzw. KN-92 versetzt war. Die Myozyten wurden mit einer Frequenz von 1 Hz bei einer Spannung von 20 V elektrisch feldstimuliert. Nach Beginn der Superfusion wurde 5 min abgewartet, bevor Messungen in der Kammer begonnen wurden, um ein komplettes

Auswaschen des Farbstoffs, dessen vollständige De-Esterifizierung in den Zellen und die Äquilibration der Zellen unter der jetzt erstmalig erfolgenden elektrischen Stimulation zu erlauben. Nun wurde ein einzelner Kardiomyozyt im Sichtfeld eingestellt, die Umgebung der Zelle ausgeblendet und entsprechend oben beschriebem Vorgehen zur ratiometrischen Fluoreszenzmessung mit Fura-2 bei pausierter Stimulation das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzsignal gemessen (Ratio der Fluoreszenzemission bei alternierender Exzitation mit 340 und 380 nm Anregungswellenlänge). Anschließend wurde die Hintergrundfluoreszenz im Bereich der Zelle aufgezeichnet (welche für die folgende Auswertung subtrahiert werden musste), die elektrische Stimulation erneut aufgenommen und eine weitere Zelle eingestellt.

### 2.4.6 Versuchsprotokoll zur Messung des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts

Zur Messung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wurden die Kardiomyozyten wie in Kap. 2.4.5 beschrieben vorbereitet, jedoch mit einer Farbstofflösung mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Fluo-3 AM beladen (30 min bei RT). Diese war, wie auch die Messlösung, ebenfalls mit KN-93 bzw. KN-92 versetzt. Nach Erreichen konstanter Versuchsbedingungen nach 5-minütiger Superfusion mit Messlösung und Stimulation mit 1 Hz wurde im weiteren Versuchsverlauf die Stimulation für 1 s gestoppt und eine 10 mmol/L Koffein-Lösung direkt auf die Zelle appliziert.

Wie in Kap. 2.2.2 bereits beschrieben, führt Koffein zur reversiblen vollständigen Öffnung der RyR2 und sorgt so für eine vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Damit repräsentiert die Amplitude des Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten den SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt (siehe Kap. 2.4.8).

Die Rationale für die Verwendung von Fluo-3 für diese Messungen war das geringere Signalrauschen bei diesem Farbstoff im Vergleich zu Fura-2, so dass hiermit Anstieg und Abfall des Koffein-induzierten Fluoreszenzsignals besser verfolgt werden können. Die Wellenlänge des Exzitationslichts betrug  $480 \pm 15$  nm, die emittierte Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von  $535 \pm 20$  nm gemessen.



### 2.4.7 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Einfluss von Tetracain

Für diese Messungen wurden die Herzmuskelzellen wie in Kap. 2.4.5 genannt vorbereitet und wie gehabt mit einer Farbstofflösung mit  $10 \mu\text{mol/L}$  Fura-2 AM inkubiert (20 min bei RT), jedoch ohne Zusatz von KN-93 oder KN-92. In diesen Versuchen war die Superfusionslösung entweder Messlösung versetzt mit  $1 \text{ mmol/L}$  Tetracain oder Messlösung ohne Zusatz als Kontrolle. In der genannten Konzentration führt Tetracain zum kompletten Verschluss der RyR2, so dass im Vergleich von Tetracaingruppe und Kontrollgruppe der Einfluss des diastolischen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks durch die RyR2 auf die diastolische cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration untersucht werden konnte. Nach Erreichen konstanter Messbedingungen wurden analog zu den in Kap. 2.4.5 beschriebenen Messungen die Fluoreszenzsignale registriert.

### 2.4.8 Auswertung der Epifluoreszenzmessungen

Die mittels Epifluoreszenzmikroskopie generierten Daten wurden mithilfe der Software IonWizard Analyze 5.0 (ION OPTIX) graphisch dargestellt und analysiert. Sowohl für Messungen mit Fura-2, als auch für solche mit Fluo-3 wurden die mitgemessenen unspezifischen Hintergrundsignale (insbesondere Streulicht und Autofluoreszenz) der jeweiligen Zelle zunächst vom Fluoreszenzsignal subtrahiert.

Zur Berechnung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte durch die Software die Berechnung der Ratio der Fluoreszenz nach alternierender Anregung bei 340 und 380 nm. Die Messungen zeigten stabile diastolische Signale in den unstimulierten Zellen; um den Einfluss des Mess-Rauschens zu minimieren, wurde der Mittelwert des Signals über einige Sekunden Dauer ermittelt. Wie in Kap. 2.4.3 in Formel 2.3 ausgeführt, wurde hieraus mittels der Grynkiewicz-Gleichung die jeweilige diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet.

Zur Berechnung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wurde mittels IonWizard zunächst die Amplitude der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten als  $F/F_0$  ausgewertet. Anschließend wurde wie in Kap. 2.4.4 ausgeführt (Formel 2.4) hieraus die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet. Hierfür wurden die aus den Messungen mit Fura-2 bestimmten mittleren diastolischen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von  $163,5 \text{ nmol/L}$  (Sinusrhythmus) und  $229,4$

nmol/L (Vorhofflimmern) zugrunde gelegt, wie in Kap. 3.5.1 dargelegt.

Zur Berechnung des absoluten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wurde analog zu den Berechnungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks vorgegangen (siehe Kap. 2.5.4).

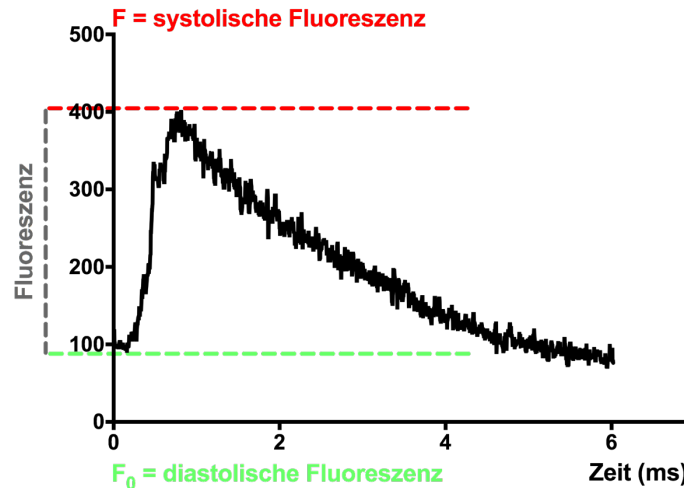


Abbildung 2.10: Beispiel eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zur Veranschaulichung der Amplitudenberechnung.

### 2.5 Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie

Eine Standard-Methode zur Untersuchung des diastolischen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks ist die Messung von sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks. Wie bereits in Kap. 1.5 näher erläutert sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks elementare lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseignisse aus dem SR in das Cytosol, welche durch das Öffnen ganzer Cluster von RyR2 entstehen (84). Die Messung dieser subzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wird durch die konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Wie unten ausgeführt, ermöglicht die Konfokalmikroskopie dabei die Bildgebung in einer Schnittebene durch die Zelle und durch das Laserscanning-Verfahren (punktuelle Fluoreszenzanregung mit dem Laser) wird es möglich, in dieser Ebene die zur Spark-Registrierung benötigten scharf räumlich definierten Bilder zu erzeugen.

### 2.5.1 Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Hier wird das Licht, welches nicht aus der Brennebene des Objekts kommt, durch einen komplizierten Aufbau von Linsen und Lochblenden ausgeblendet, so dass letztlich nur eine horizontale Schnittebene durch das Präparat abgebildet wird. Ein vereinfachtes Schema hierzu ist in Abb. 2.11 dargestellt.

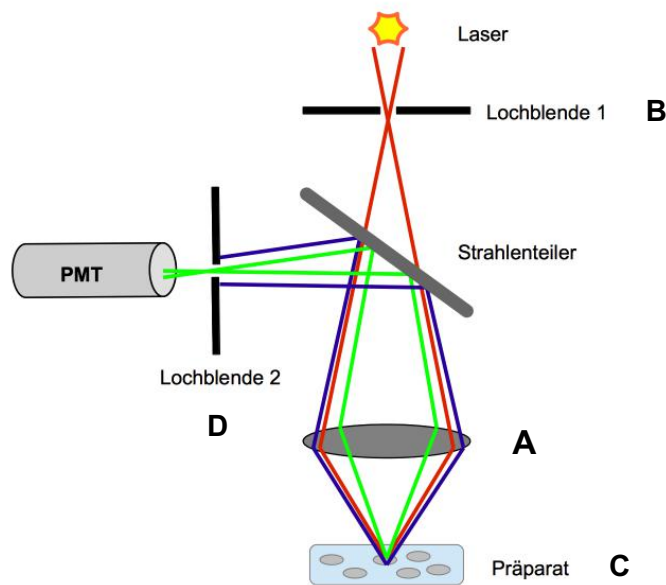
Ein vollständiges konfokalmikroskopisches Laserscanning-Setup setzt sich zusammen aus Lichtquelle (Laser), Mikroskop, Scan-Modul, Photomultiplier, Steuerungsmodul und Rechner mit der entsprechenden Software.

Laserlicht eignet sich für diese Anwendung besonders gut, weil ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussieren kann. So ist eine punktgenaue Anregung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Argon-Laser (Licht mit 488 nm Wellenlänge) verwendet.

Durch den Laserscan wird im Unterschied zur konventionellen Mikroskopie zunächst nur ein Bildpunkt erzeugt. Ein Bild entsteht erst, indem das Objekt Punkt für Punkt gerastert wird. Diese Punkte werden digitalisiert und am Computer zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Bei modernen Laserscanning-Konfokalmikroskopen wird ein Laserstrahl mit Hilfe von computergesteuerten verstellbaren Spiegeln Punkt für Punkt in der X- und Y-Achse über das Objekt geführt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird zum Detektor (Photomultiplier) geleitet.

Der Photomultiplier nimmt die Fluoreszenzsignale auf, wandelt sie in elektrische Spannung um, verstärkt das Signal und leitet es weiter. Das Steuermodul fungiert als Mittler zwischen Fluoreszenz-Setup und Computer und enthält den AD-Wandler. Dieser wandelt analoge Signale, z.B. elektrische Spannung, in digitale Signale um. Das gesamte Setup wird mittels Computer gesteuert.

In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend Line-Scans der untersuchten Zellen durchgeführt; das heißt, der Laserstrahl wird in einer definierten Zeit mehrfach über eine definierte Linie geführt und das emittierte Fluoreszenzlicht wird über die Zeit gemessen.



**Abbildung 2.11: Prinzip der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie.** Die Kondensorlinse wird durch eine Linse (A) ersetzt, die der Objektivlinse identisch ist. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Lochblende (B) beschränkt, die auf dem Objekt (C) scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende (D) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau dieses Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, dass Licht aus Bereichen des Objekts, die nicht in der Brennebene liegen, nicht in die Apertur der Blende (D) fallen und damit ausgeblendet werden (hier: rote und blaue Strahlen). In den Photomultiplier (PMT) gelangt deshalb nur Licht aus der Brennebene des Objekts (grüne Strahlen). Modifiziert nach Minsky 1988 (134).

### 2.5.2 Versuchsprotokoll zur Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks

Alle Experimente wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss AG, Oberkochen), ausgestattet mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv, unter Verwendung des Farbstoffs Fluo-3 AM (vgl. Kap. 2.4.4) durchgeführt. Wie auch bei der Epifluoreszenzmikroskopie wurden die frisch isolierten Myokardzellen auf Collagen plattiert und mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Fluo-3 AM sowie KN-93 oder KN-92 lichtgeschützt inkubiert (30 min bei RT; vgl. Kap. 2.4.5). Die Messlösung wurde mit 1  $\mu\text{mol/L}$  KN-93 zur CaMKII-Inhibition bzw. mit 1  $\mu\text{mol/L}$  KN-92 als Kontrolle versetzt. Vor Beginn der Messungen wurde der überschüssige und extrazellulär verbliebene Farbstoff sowie Zelldetritus über eine Zeit von 5 min mit Messlösung ausgewaschen und auch während

der Messungen wurden die Zellen kontinuierlich mit Messlösung superfundiert. Der Argon-Laser regte Fluo-3 mit einer Wellenlänge von 488 nm an, die emittierte Fluoreszenz wurde durch einen Emissionsfilter (505 nm) zum Photomultiplier geleitet. Im „Line-Scan“-Modus wurden die generierten Fluoreszenzbilder mit folgenden Einstellungen registriert: 512 Pixel (d.h. Bildpunkte) pro Linie, Scanbreite 38,4  $\mu\text{m}$ , Pixelzeit 0,64  $\mu\text{s}$ , Pixelgröße 0,75  $\mu\text{m}$  x 0,75  $\mu\text{m}$ , Intensitätsauflösung 12 bit, unidirektionaler Scan mit 1302 Zeilen pro Sekunde.

### 2.5.3 Versuchsprotokoll zur Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter Tetracain

Wie bei den vorgenannten Messungen wurden die frisch isolierten Kardiomyozyten auf Collagen plattiert und mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Fluo-3 AM lichtgeschützt inkubiert (30 min bei RT). Die Messlösung wurde mit 1 mmol/L Tetracain versetzt, als Kontrolle diente Messlösung ohne Tetracain-Zusatz.

Die Messungen wurden wie in Kap. 2.5.2 beschrieben durchgeführt und die Fluoreszenzbilder mit den dort genannten Einstellungen registriert.

### 2.5.4 Datengenerierung und -auswertung

Über das zum Konfokal-Setup gehörige Computerprogramm AIM (Carl Zeiss AG, Oberkochen) wurden die gemessenen Daten gespeichert. Jeder einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark wurde in einem 30 Pixel breiten Fenster ausgewertet. Hierbei wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensität über den 30 Pixel breiten Ausschnitt gebildet und das Signal durch einen 7 Sample langen Running-Median-Filter gefiltert. Nach der Formel, die in Kap. 2.4.4 gezeigt ist, wurde für den jeweiligen Zeitpunkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet und die Sparkgröße als Fläche unter der Kurve bestimmt (unter Zugrundelegung der für die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessenen Werte aus den kalibrierten Messungen mit Fura-2). Sparkgröße und Anzahl der Sparks wurden ausgewertet und für jede Zelle in eine Tabelle (Microsoft Excel, Microsoft Corp., Redmond / USA) übertragen, wobei aus der Anzahl der in der für 5000 Lines 3,84 s dauernden Aufzeichnungsperiode auftretenden Sparks die Sparkfrequenz berechnet wurde.

(angegeben in 1/pL/s unter Zugrundelegung einer volumetrischen Größe von  $0,75 \times 0,75 \times 0,75 \mu\text{m}^3$  für jedes Pixel).

### 2.6 Bestimmung der Zelldimensionen

Zur Bestimmung der Zelldimensionen der untersuchten Kardiomyozyten wurden mit dem Konfokalmikroskop zudem 2D-Bilder der Kardiomyozyten aufgenommen. In diesen wurden Länge und Breite der Zellen vermessen.

Um das Zellvolumen zu bestimmen, wurde nun nach Bers folgende Formel verwendet (19):

$$\text{Zellvolumen} = \text{Länge} \cdot \text{Breite} \cdot (0,4 \cdot \text{Breite})$$

Formel 2.5

### 2.7 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen

Wie in Kap. 2.3 beschrieben, wurde von den entnommenen Gewebeproben jeweils ein Teil für Western Blot-Analysen asserviert. Die Herstellung der Proteinhomogenate sowie die Gelelektrophorese und der elektrophoretische Transfer ebenso wie die Markierung der Proteine mit Antikörpern wurden von Frau Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova vorgenommen. Daher soll hier auf die jeweiligen Versuchsabläufe nicht näher eingegangen werden.

Nach Messung der Bandenintensitäten mit einem Imaging-Densitometer erfolgte die weitere Auswertung gemeinsam. Untersucht wurde die Proteinexpression von CaMKII, RyR2, SERCA2a und PLB, wobei hier jeweils auf die Proteinexpression von GAPDH normalisiert wurde. Des weiteren wurde der Phosphorylierungsstatus der CaMKII untersucht sowie der Phosphorylierungsstatus des RyR2 an Ser-2814 und Ser-2808 und von PLB an Thr-17. Hier wurde jeweils auf die Expression des jeweiligen Proteins normalisiert.

## **2.8 Statistik und Datenauswertung**

Nach Auswertung der Daten in den entsprechenden oben genannten Computerprogrammen wurden sie in Microsoft Excel und GraphPad Prism™ 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla / USA) importiert. Diese Programme ermöglichten die statistische und graphische Auswertung.

Im folgenden Ergebnisteil werden die generierten Messwerte als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts („Standard error of the mean“ = SEM) dargestellt.

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{Formel 2.6}$$

|            |                    |
|------------|--------------------|
| $n$        | Anzahl             |
| $\sigma^2$ | Varianz            |
| $\sigma$   | Standardabweichung |

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test für ungepaarte Werte in Microsoft Excel bzw. als Ein-Wege-ANOVA in GraphPad Prism™ 7.0. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Daten des verwendeten humanen Myokards

Insgesamt wurden für die vorliegende Dissertation Gewebeproben von 47 Patienten verwendet. 21 Patienten waren der Gruppe mit Vorhofflimmern zuzuordnen, die Gruppe mit Sinusrhythmus bestand aus 27 Patienten. Von den Patienten waren 34 männlichen sowie 14 weiblichen Geschlechts. Alle Patienten der Gruppe mit Vorhofflimmern wiesen direkt präoperativ ein im EKG dokumentiertes Vorhofflimmern auf, bei den Patienten der Gruppe mit Sinusrhythmus war dieser ebenfalls direkt präoperativ elektrokardiographisch dokumentiert. Bei 76,2% der Patienten mit Vorhofflimmern war die Rhythmusstörung des weiteren als chronisch beschrieben, bei den übrigen als paroxysmal oder persistierend.

Passend zur zunehmenden Inzidenz von Vorhofflimmern im Alter waren die Patienten mit Vorhofflimmern mit einem mittleren Alter von  $72,0 \pm 1,7$  Jahren signifikant etwas älter als die Sinusrhythmus-Patienten ( $65,2 \pm 1,9$  Jahre). Ansonsten bestanden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf linksventrikuläre Funktion (48,8% bzw. 57,2%), schwere Mitralklappeninsuffizienz (9,5% bzw. 11,1%), die Inzidenz von Diabetes mellitus (28,6% bzw. 40,7%) oder die präoperative Medikation. Ein Großteil der Patienten (76,2% bzw. 70,4%) erhielt eine Medikation mit  $\beta$ -Blockern. Keiner der Patienten erhielt eine weitere antiarrhythmische Medikation. Insgesamt wiesen 81,3% der Patienten eine behandlungsbedürftige koronare Herzerkrankung auf und unterzogen sich einer Bypassoperation, in der Gruppe mit Vorhofflimmern waren es 70,0%, in der Gruppe mit Sinusrhythmus 89,3%. Detailliert dargestellt ist die Auswertung der Patientendaten in Tab. 3.1.



|                             |            | Echokardio-<br>graphie |           |                |      | Medikation<br>(%) |                     |               |      |
|-----------------------------|------------|------------------------|-----------|----------------|------|-------------------|---------------------|---------------|------|
|                             |            | Alter<br>(Jahre)       | EF<br>(%) | MI III°<br>(%) | β-B  | AA                | Ca <sup>2+</sup> -A | ACE-I/<br>ARB | DIU  |
| <b>Vorhof-<br/>flimmern</b> | Mittelwert | 72,0 *                 | 48,8      | 9,5            | 76,2 | 0                 | 20,0                | 80,0          | 85,7 |
|                             | ± SEM      | ±1,7                   | ±3,6      |                |      |                   |                     |               |      |
| <b>Sinus-<br/>rhythmus</b>  | Mittelwert | 65,2                   | 57,2      | 11,1           | 70,4 | 0                 | 14,8                | 85,2          | 44,4 |
|                             | ± SEM      | ±1,9                   | ±2,3      |                |      |                   |                     |               |      |

**Tabelle 3.1: Wichtige Daten des Patientenkollektivs. Übersicht über Alter, Hämodynamik (Mittelwert ± SEM) und medikamentöse Therapie (%) der verwendeten humanen atrialen Gewebeproben.** SEM: Standardfehler des Mittelwerts, EF: Ejektionsfraktion, MI: Mitralklappeninsuffizienz, β-B: β-Blocker, AA: Antiarrhythmika, Ca<sup>2+</sup>-A: Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten, ACE-I: ACE-Hemmer, ARB: AT1-Rezeptor-Blocker, DIU: Diuretika, \*P<0,05 vs. Sinusrhythmus.

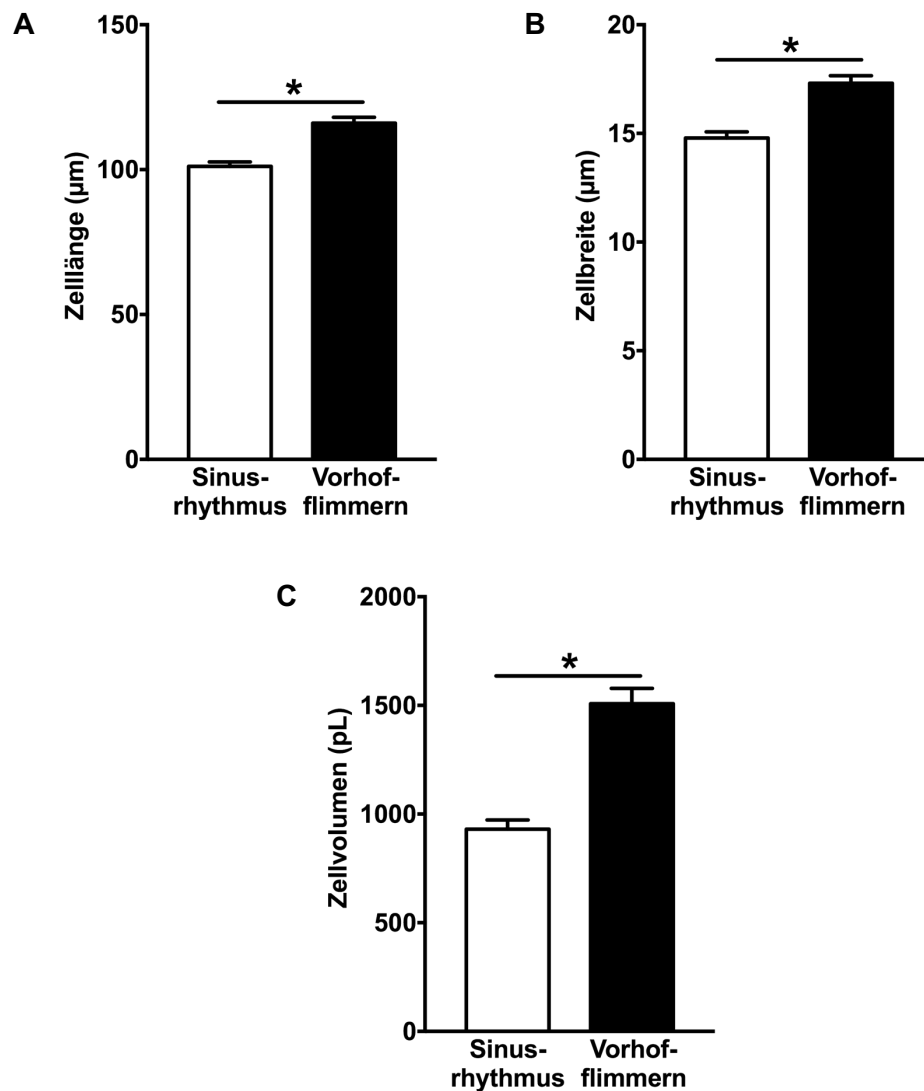
### 3.2 Einfluss des Herzrhythmus auf die Zelldimensionen

Um mögliche Einflüsse des Herzrhythmus auf die Zelldimensionen im Sinne einer Zellhypertrophie aufzuzeigen, wurde während der Messungen mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop die Größe der einzelnen Kardiomyozyten bestimmt. Insgesamt wurden die Zellen von 8 Patienten mit Vorhofflimmern sowie von 7 Patienten mit Sinusrhythmus ausgemessen.

Es zeigte sich, dass die Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern mit  $116,1 \pm 2,0 \mu\text{m}$  signifikant länger waren als jene Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus mit einer Länge von  $101,1 \pm 1,5 \mu\text{m}$  (Vorhofflimmern, n=134 vs. Sinusrhythmus, n=115; P<0,05, Abb. 3.1 A). Ebenfalls war bei der Zellbreite bei Vorhofflimmern eine signifikante Zunahme auf  $17,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu verzeichnen im Vergleich zu Sinusrhythmus mit einer Breite von  $14,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$  (P<0,05, Abb. 3.1 B). Wurde aus den genannten Parametern nach der in Kap. 2.6 angegebenen Formel das Zellvolumen berechnet, so ergab sich hier bei Vorhofflimmern ebenfalls ein deutlich vergrößertes Volumen mit  $1507,9 \pm 70,8 \text{ pL}$ ; im Vergleich betrug bei Sinusrhythmus das Zellvolumen  $930,4 \pm 42,3 \text{ pL}$  (P<0,05, Abb.

3.1 C).

Es zeigt sich also bei Patienten mit Vorhofflimmern eine deutliche Zellhypertrophie der Vorhofmyozyten im Vergleich zu Sinusrhythmus.



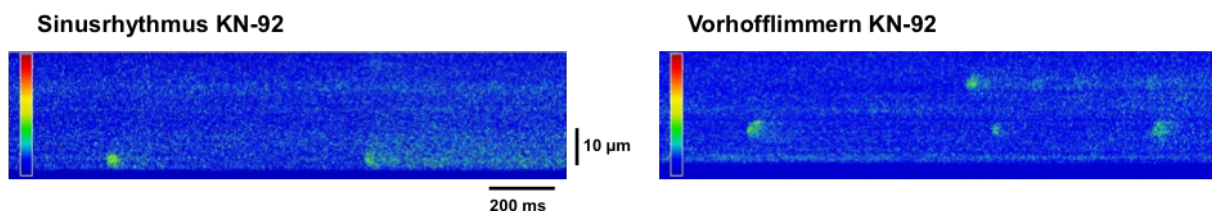
**Abbildung 3.1: Zellhypertrophie von rechtsatrialen Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern verglichen mit Sinusrhythmus. A und B:** Signifikante Zunahme der Zelllänge (A) und -breite (B) bei Vorhofflimmern (n=134 vs. Sinusrhythmus, n=115; \*P<0,05). **C:** Ebenfalls signifikante Vergrößerung des Zellvolumens bei Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus (n=134 vs. n=115; \*P<0,05).

### 3.3 Untersuchung des $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks des Sarkoplasmatischen Retikulums bei Vorhofflimmern

Der Einfluss von Vorhofflimmern auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck des Sarkoplasmatischen Retikulums wurde durch Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks mittels konfokaler Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Rolle der CaMKII hierbei wurde durch CaMKII-Inhibition mit KN-93 im Vergleich zu Messungen unter Kontrollbedingungen mit KN-92 als Kontrollsubstanz (siehe Kap. 1.3.4) untersucht.

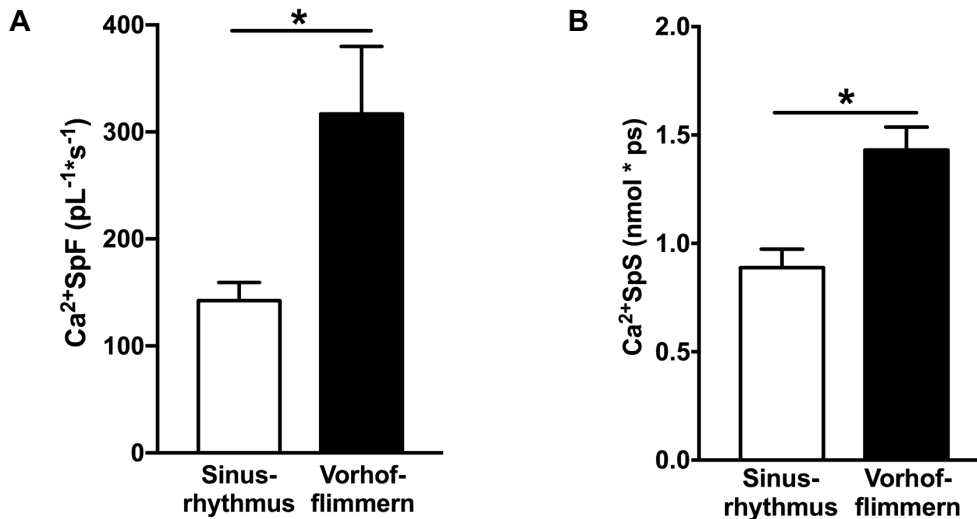
#### 3.3.1 SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck unter Kontrollbedingungen

Wie in Abb. 3.2 durch Originalregistrierungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks illustriert, zeigt sich unter Kontrollbedingungen (KN-92, also keine CaMKII-Inhibition) in Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz deutlich und hoch signifikant gesteigert mit  $316,7 \pm 63,1 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  verglichen mit einer Sparkfrequenz von  $142,4 \pm 16,9 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus (Vorhofflimmern,  $n=19$  vs. Sinusrhythmus,  $n=32$  Zellen aus 9 vs. 10 Patienten;  $P < 0,001$ ; Abb. 3.3 A).



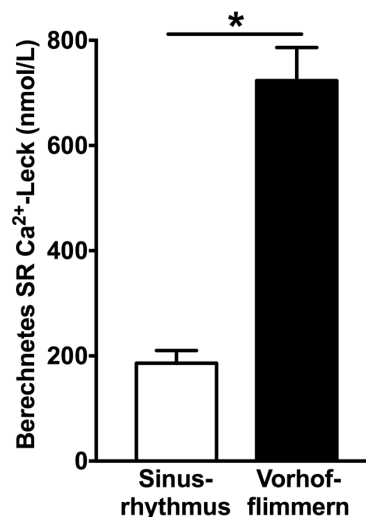
**Abbildung 3.2: Originalregistrierungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks in Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (KN-92).** Aufgenommen mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop im Line-Scan-Modus. Die Farbskala jeweils links kodiert die Farbintensität des emittierten Fluoreszenzsignals.

Auch die Größe der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks ist bei Vorhofflimmern signifikant erhöht mit  $1,43 \pm 0,11 \text{ nmol} \times \text{ps}$  verglichen mit  $0,89 \pm 0,09 \text{ nmol} \times \text{ps}$  bei Sinusrhythmus (Vorhofflimmern,  $n=96$  vs. Sinusrhythmus,  $n=72$  Sparks aus 9 vs. 10 Patienten,  $P < 0,05$ ; Abb. 3.3 B).



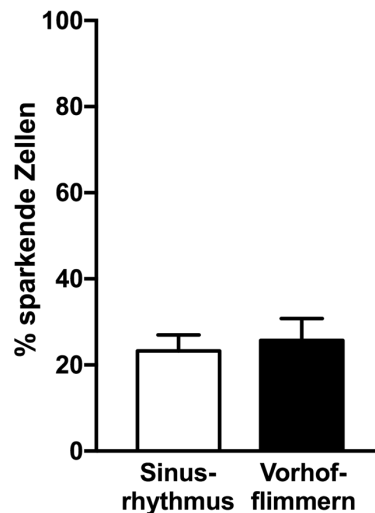
**Abbildung 3.3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz (A) und Sparkgröße (B) bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (KN-92).**  $\text{Ca}^{2+}\text{SpF}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz,  $\text{Ca}^{2+}\text{SpS}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkgröße (Vorhofflimmern/KN-92,  $n=96$  Sparks aus 19 Zellen vs. Sinusrhythmus/KN-92,  $n=72$  Sparks aus 32 Zellen;  $*P<0,05$ ).

Aus Frequenz und Größe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks lässt sich nun das totale SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck pro Zelle berechnen. Hier ergibt sich ein vielfacher Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks des SR um das 3,9-fache von  $186,0 \pm 24,0$  nmol/L bei Sinusrhythmus auf  $723,3 \pm 62,9$  nmol/L bei Vorhofflimmern (Vorhofflimmern,  $n=19$  Zellen vs. Sinusrhythmus,  $n=32$ ,  $P<0.05$ , Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4: Totales SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck pro Zelle bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (KN-92)** (Vorhofflimmern,  $n=19$  Zellen vs. Sinusrhythmus,  $n=32$  Zellen,  $*P<0,05$ ).

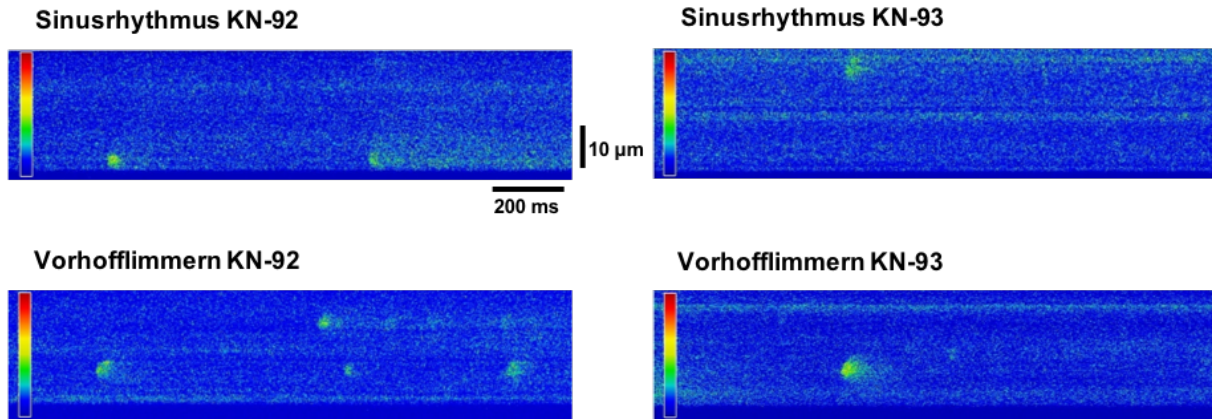
Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich außerdem, dass bei Vorhofflimmern der Anteil der Zellen, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks aufwiesen, ungefähr gleich war im Vergleich zu Sinusrhythmus. Unter Kontrollbedingungen wurden 72 Zellen von 9 Patienten mit Vorhofflimmern untersucht, von denen 25,7%  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks aufwiesen. Von 13 Patienten mit Sinusrhythmus wurden 137 Zellen untersucht, bei denen 24,1% Sparks aufwiesen (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5:** Anteil der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen unter Kontrollbedingungen mit KN-92 (Vorhofflimmern, n=72 Zellen vs. Sinusrhythmus, n=137 Zellen).

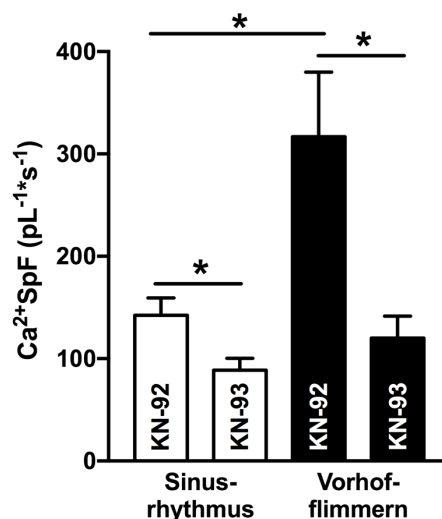
#### 3.3.2 CaMKII-Abhängigkeit des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks

Um zu untersuchen, ob bzw. wie ausgeprägt das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck CaMKII-abhängig ist, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkmessungen unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 durchgeführt. Wie in Abb. 3.7 abgebildet, konnte eine drastische Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz in Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern festgestellt werden von  $316,7 \pm 63,1 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  (n=19 Zellen) auf  $120,0 \pm 21,5 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  (n=11 Zellen von 5 Patienten,  $P < 0,05$ ), wie auch in Abb. 3.6 in Originalregistrierungen illustriert. Dies bedeutet eine Normalisierung der Sparkfrequenz auf das Niveau der Kontrollwerte bei Sinusrhythmus bzw. im Trend sogar etwas darunter (Abb. 3.7).



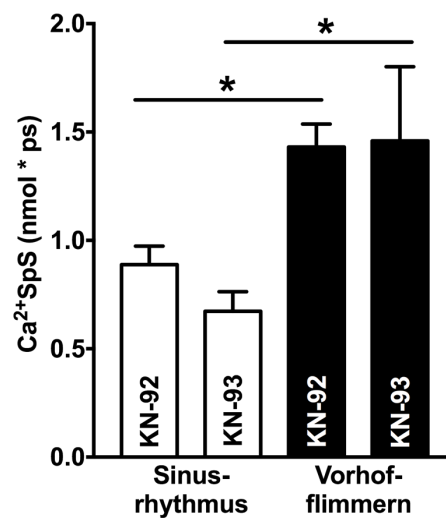
**Abbildung 3.6:** Originalregistrierungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 (rechts) im Vergleich zu Kontrollbedingungen (KN-92, links) illustrieren die Normalisierung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks in Vorhofflimmern. Aufgenommen mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop im Line-Scan-Modus. Die Farbskala jeweils links kodiert die Farbintensität des emittierten Fluoreszenzsignals.

Auch in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus kam es durch die CaMKII-Inhibition zu einer Reduktion der Sparkfrequenz unter das Ausgangsniveau, welche aber mit einer Verringerung von  $142,4 \pm 16,9 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  ( $n=32$  Zellen) auf  $88,7 \pm 19,5 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  ( $n=19$  Zellen von 10 Patienten) wesentlich geringer ausfiel (aber trotzdem signifikant war,  $P < 0,05$ ).



**Abbildung 3.7:** Signifikante Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz ( $\text{Ca}^{2+}\text{SpF}$ ) durch Inhibition der CaMKII mit KN-93 bei Vorhofflimmern (Vorhofflimmern/KN-92,  $n=96$  Sparks aus 19 Zellen; Vorhofflimmern/KN-93,  $n=21$  Sparks aus 11 Zellen; Sinusrhythmus/KN-92,  $n=72$  Sparks aus 32 Zellen; Sinusrhythmus/KN-93,  $n=28$  Sparks aus 19 Zellen;  $*P < 0,05$ ).

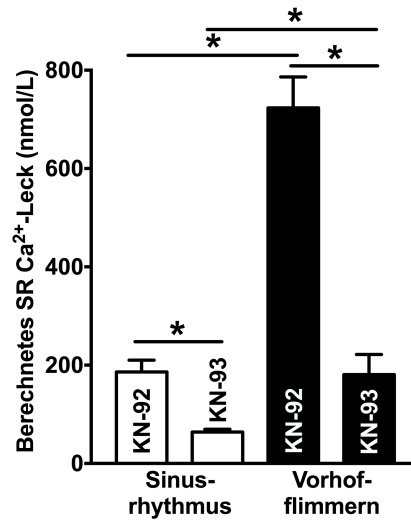
Währenddessen zeigte die CaMKII-Inhibition weder in der Gruppe mit Vorhofflimmern noch in der Gruppe mit Sinusrhythmus signifikante Auswirkungen auf die Größe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks (Abb. 3.8). Bei Kardiomyozyten mit Vorhofflimmern blieb unter KN-93 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkgröße nahezu identisch mit  $1,46 \pm 0,34 \text{ nmol} \times \text{ps}$  ( $n=21$  Sparks), auch in Zellen der Gruppe mit Sinusrhythmus zeigte sich mit  $0,67 \pm 0,09 \text{ nmol} \times \text{ps}$  ( $n=28$  Sparks) keine signifikante Veränderung. Damit blieben die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks auch unter CaMKII-Inhibition in Zellen mit Vorhofflimmern deutlich signifikant größer als in Zellen mit Sinusrhythmus unter CaMKII-Inhibition.



**Abbildung 3.8: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkgröße ( $\text{Ca}^{2+}\text{SpS}$ ) verändert sich durch Inhibition der CaMKII mit KN-93 bei Vorhofflimmern nicht** (Vorhofflimmern/KN-92,  $n=96$  Sparks aus 19 Zellen; Vorhofflimmern/KN-93,  $n=21$  Sparks aus 11 Zellen; Sinusrhythmus/KN-92,  $n=72$  Sparks aus 32 Zellen; Sinusrhythmus/KN-93,  $n=28$  Sparks aus 19 Zellen;  $*P<0,05$ ).

Entsprechend zeigt sich bei Betrachtung des aus  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz und -größe berechneten totalen zellulären SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks, dass dieses CaMKII-abhängig ist, wobei die pathologische Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks bei Vorhofflimmern durch CaMKII-Inhibition komplett normalisiert werden kann (auf das Niveau von Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen): In Zellen mit Vorhofflimmern führt KN-93 zu einer drastischen Reduktion des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks (von  $723,3 \pm 62,9$  unter KN-92 auf  $180,9 \pm 40,7 \text{ nmol/L}$  unter KN-93,  $n=19$  vs.  $n=11$  Zellen,  $p<0,05$ ), was eine komplette Normalisierung auf das Niveau des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks bei Sinusrhythmus ohne CaMKII-Inhibition ( $186,0 \pm 24,0 \text{ nmol/L}$ ) bedeutet. Auch in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus verminderte KN-93 das primär schon niedrige SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck signifikant noch weiter auf  $63,8 \pm 33,8 \text{ nmol/L}$

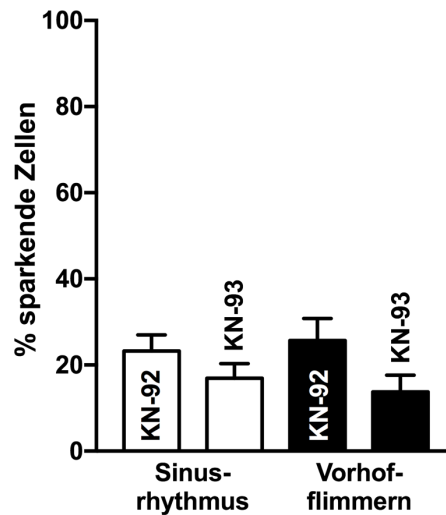
(n=19 Zellen) im Vergleich zu  $186,0 \pm 24,0$  nmol/L unter KN-92 (Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9: Totales SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck pro Zelle.** Das bei Vorhofflimmern erhöhte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck zeigt sich komplett CaMKII-abhängig, es kann mittels CaMKII-Inhibition (mit KN-93) auf das Niveau von Sinusrhythmus reduziert werden (Vorhofflimmern/KN-92, n=19 Zellen; Vorhofflimmern/KN-93, n=11 Zellen; Sinusrhythmus/KN-92, n=32 Zellen; Sinusrhythmus/KN-93, n=19 Zellen; \*P<0,05).

Durch Inhibition der CaMKII mit KN-93 wurde außerdem der Anteil der Zellen mit nachweisbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks an der Gesamtheit der untersuchten Zellen reduziert. Unter CaMKII-Inhibition wurden 80 Zellen von 9 Patienten mit Vorhofflimmern untersucht, von denen 13,8% Sparks aufwiesen. Bei Sinusrhythmus wurden 124 Zellen von 12 Patienten untersucht. Hier zeigten sich in 16,9% der Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks (Abb. 3.10).





**Abbildung 3.10:** Anteil der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen unter Inhibition der CaMKII mit KN-93 (Vorhofflimmern/KN-92, n=72 Zellen; Vorhofflimmern/KN-93, n=80 Zellen; Sinusrhythmus/KN-92, n=137 Zellen; Sinusrhythmus/KN-93, n=124 Zellen).

### 3.3.3 Weitere $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Parameter

Ergänzend zur oben dargestellten quantitativen Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkgröße basierend auf den berechneten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wurden zur Verifizierung auch die reinen Fluoreszenz-Parameter (Amplitude in  $F/F_0$  und RT 50%) sowie die Dauer der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks ausgewertet. Aufgrund der sehr viel genaueren Bestimmung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks unter Einbeziehung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und der Berechnung als Fläche unter der Kurve seien diese einzelnen Parameter hier nur ergänzend erwähnt, sie sind graphisch im Anhang in Abb. 7.1 dargestellt. Hier zeigen sich unter Kontrollbedingungen (KN-92) keine signifikanten Unterschiede in den Parametern der einzelnen Sparks zwischen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus; in Zellen mit Sinusrhythmus (nicht aber bei Vorhofflimmern) reduzierte die CaMKII-Inhibition mit KN-93 die Zeit bis zum 50%-Abfall des Sparks signifikant.

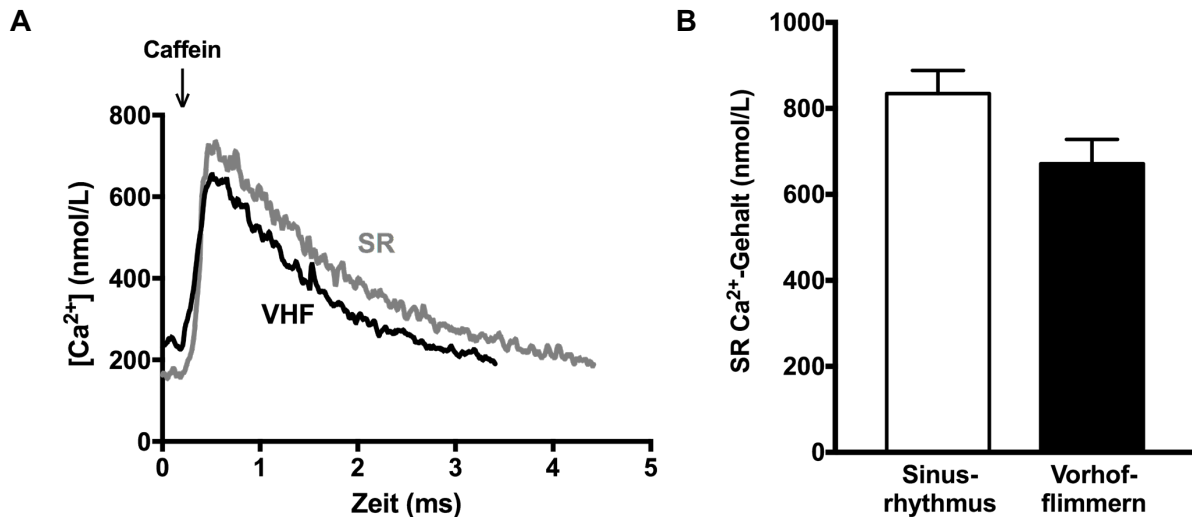
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz ist natürlich von der Methode der Berechnung der Sparkgröße unabhängig, so dass diese als wesentlicher das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern treibender Parameter (s.o.) unabhängig hiervon weiter bestehen bleibt.

### 3.4 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums bei Vorhofflimmern

Neben der „Undichtigkeit“ der RyR2 ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums der zweite wichtige Faktor, welcher Einfluss auf das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck hat (vgl. Kap. 1.5). Um zu untersuchen, in wie weit möglicherweise ein erhöhter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt eine Rolle für das vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern spielt, wurden Untersuchungen des kardiomyozytären SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts durchgeführt. Hierfür wurde die Amplitude der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten als Maß für die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung bestimmt (siehe Kap. 2.4.6).

Die hieraus ermittelte  $F/F_0$  der Fluo-3-Messungen suggeriert zunächst einmal einen bei Vorhofflimmern deutlich verminderten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ( $2,68 \pm 0,29 F/F_0$  vs.  $3,65 \pm 0,33 F/F_0$  der Koffein-Transienten bei Sinusrhythmus,  $n=22$  vs.  $n=21$  Zellen,  $P<0.05$ ). Wenn man aus diesen Transienten jedoch basierend auf den ebenfalls gemessenen diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (siehe Kap. 3.5) die tatsächlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden berechnet (vgl. Kap. 2.4.4), zeigt sich, dass dieser Unterschied in der Tat deutlich geringer und nunmehr auch nicht signifikant unterschiedlich ist: Hiernach beträgt die Amplitude der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und damit der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt  $714,30 \pm 57,32 \text{ nmol/L}$  bei Vorhofflimmern vs.  $822,26 \pm 48,54 \text{ nmol/L}$  bei Sinusrhythmus (Abb. 3.11 B).

In jedem Fall ist der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bei Vorhofflimmern gegenüber Sinusrhythmus nicht signifikant erhöht, sondern im Gegenteil eher geringer und damit auch nicht als Ursache des vermehrten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks anzusehen. Abb. 3.11 A illustriert exemplarisch zwei Koffein-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus.



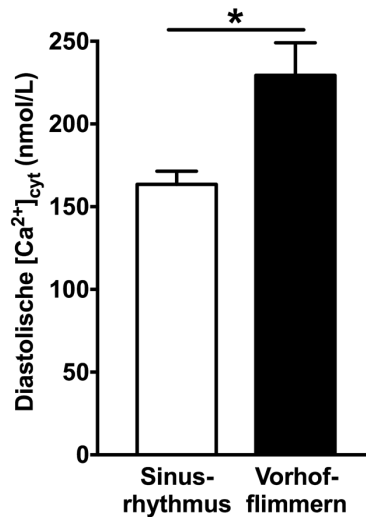
**Abbildung 3.11: SR  $Ca^{2+}$ -Gehalt bei Vorhofflimmern im Vergleich mit Sinusrhythmus.** **A:** Originalregistrierungen von Koffein-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus. **B:** Es besteht kein signifikanter Unterschied im SR  $Ca^{2+}$ -Gehalt bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern (Vorhofflimmern,  $n=22$  vs. Sinusrhythmus,  $n=21$ ,  $P=0,16$ ).

### 3.5 Untersuchung der diastolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration des Cytosols bei Vorhofflimmern

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurden mit dem ratiometrischen  $Ca^{2+}$ -Farbstoff Fura-2 Messungen der freien diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration des Cytosols ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) durchgeführt, wobei die absoluten  $Ca^{2+}$ -Werte zu den jeweiligen Fura-2-Ratios berechnet werden konnten (siehe Kap. 2.4.3).

#### 3.5.1 Diastolische $Ca^{2+}$ -Konzentration im Cytosol unter Kontrollbedingungen

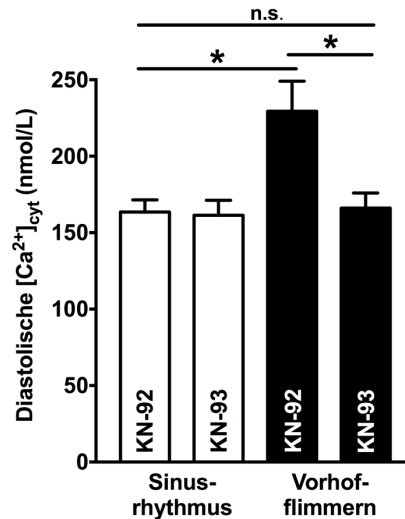
Bei Vorhofflimmern zeigte sich die diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration unter Kontrollbedingungen (KN-92) mit  $229,4 \pm 19,6$  nmol/L signifikant erhöht im Vergleich zu Sinusrhythmus mit  $163,5 \pm 7,9$  nmol/L (Vorhofflimmern,  $n=33$  Zellen vs. Sinusrhythmus,  $n=43$  Zellen,  $P<0,05$ ; Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12:** Der diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Cytosols ist bei Vorhofflimmern erhöht unter Kontrollbedingungen (KN-92) (Vorhofflimmern,  $n=33$  vs. Sinusrhythmus,  $n=43$ ;  $*P<0,05$ ).

### 3.5.2 CaMKII-Abhängigkeit der diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Cytosols

Die Inhibition der CaMKII mittels KN-93 zeigte, dass die pathologische Erhöhung der freien diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern komplett auf die CaMKII zurückführbar ist: Die CaMKII-Inhibition führte zur kompletten Normalisierung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern von  $229,4 \pm 19,6$  nmol/L auf  $166,1 \pm 9,9$  nmol/L (Vorhofflimmern mit KN-92,  $n=33$  Zellen vs. Vorhofflimmern mit KN-93,  $n=36$  Zellen;  $P<0,05$ ; Abb. 3.13). Dieser Wert entspricht einer Reduktion der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf den Wert von Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus unter Kontrollbedingungen (mit  $163,5 \pm 7,9$  nmol/L, s.o.). Im Gegensatz zu Vorhofflimmern führte die CaMKII-Inhibition mit KN-93 in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus zu keiner weiteren Reduktion der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle mit KN-92 ( $161,4 \pm 9,8$  nmol/L,  $n=34$ ; Abb. 3.13).



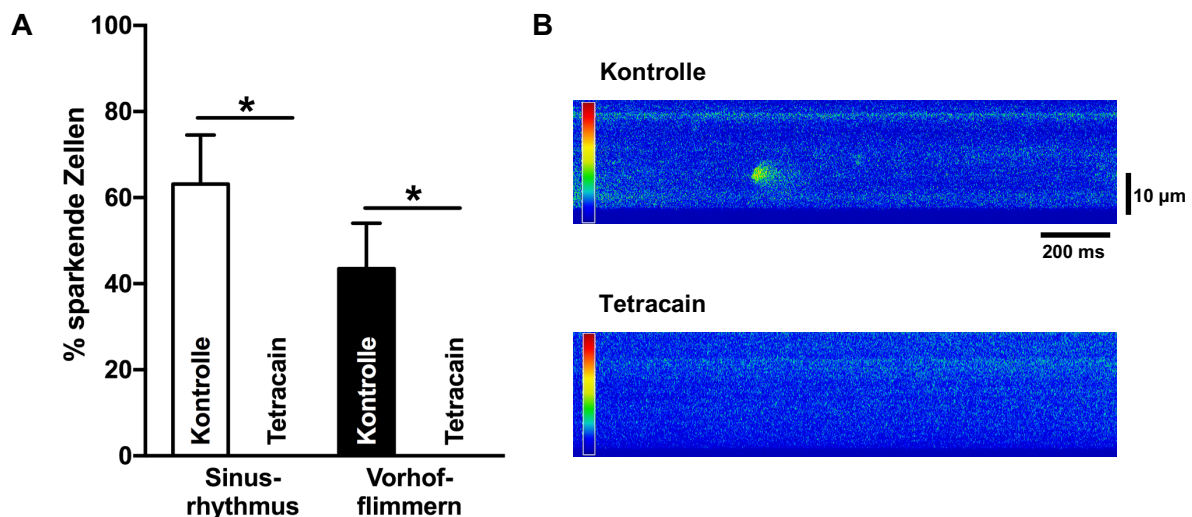
**Abbildung 3.13: Normalisierung der cytosolischen diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern durch CaMKII-Inhibition mit KN-93** (Vorhofflimmern/KN-92, n=33; Vorhofflimmern/KN-93, n=36; Sinusrhythmus/KN-92, n=43; Sinusrhythmus/KN-93, n=34; \* $P < 0,05$ ).

### 3.6 Tetracain-Experimente zur Untersuchung des Einflusses des SR $Ca^{2+}$ -Lecks auf die diastolische $Ca^{2+}$ -Konzentration

Weiterhin sollte untersucht werden, ob tatsächlich das vermehrte diastolische SR  $Ca^{2+}$ -Leck Ursache der erhöhten diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern ist. Hierfür wurden Messungen unter Verwendung von Tetracain durchgeführt. Tetracain führt zu einem kompletten Verschluss der RyR2, so dass der Einfluss des SR  $Ca^{2+}$ -Lecks auf die diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration unterbunden wird (vgl. Kap. 2.2.3 und 2.4.7). Sofern die bei Vorhofflimmern erhöhte diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration also ausschließlich durch permanent aus dem SR leckendes  $Ca^{2+}$  bedingt ist, sollte in Zellen mit Vorhofflimmern unter Tetracain die diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration identisch mit der von Zellen im Sinusrhythmus sein.

### 3.6.1 Einfluss von Tetracain auf das SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck

In einem ersten Schritt sollte verifiziert werden, dass Tetracain tatsächlich zum Verschluss des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks führt. Sowohl in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus als auch in solchen von Patienten mit Vorhofflimmern führte Tetracain zu einem kompletten Erlöschen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks. Verglichen wurde hier mit Zellen von denselben Patienten, welche als Kontrollgruppe mit Messlösung ohne Wirkstoff behandelt wurden. In der Kontrollgruppe zeigten 12 von 19 Zellen bei Sinusrhythmus (2 Patienten) Sparks sowie 7 von 16 Zellen bei Vorhofflimmern (2 Patienten). Unter Tetracain waren in 0 von 21 Zellen der Patienten mit Sinusrhythmus und ebenfalls in 0 von 14 Zellen der Patienten mit Vorhofflimmern Sparks sichtbar (jeweils  $P < 0,05$  für das Auftreten von Sparks unter Tetracain vs. Kontrolle, Fisher-Test; Abb. 3.14 A). In Abb. 3.14 B veranschaulichen Originalregistrierungen noch einmal das Verlöschen der Sparks.

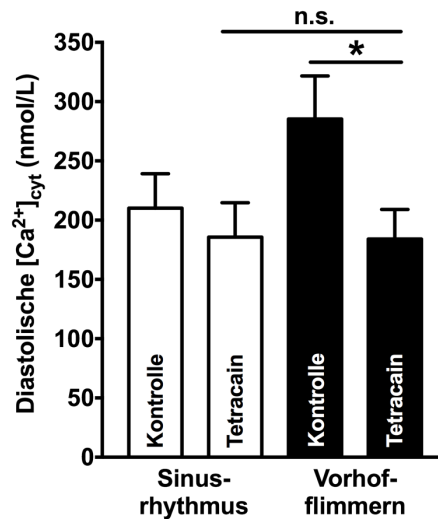


**Abbildung 3.14: Die Hemmung der RyR2 durch Tetracain verhindert das Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks.** **A:** Graphische Darstellung der Suppression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks durch Tetracain (Vorhofflimmern/Kontrolle,  $n=14$  vs. Vorhofflimmern/Tetracain,  $n=16$ ; Sinusrhythmus/Kontrolle,  $n=19$  vs. Sinusrhythmus/Tetracain,  $n=21$ ;  $*P < 0,05$ ). **B:** Originalregistrierungen im Line-Scan-Modus illustrieren das Verlöschen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks.

#### 3.6.2 Einfluss von Tetracain auf die diastolische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurde der Einfluss von Tetracain auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in mit Fura-2 gefärbten Myokardzellen gemessen.

Tetracain führte in Kardiomyozyten mit Vorhofflimmern zu einer signifikanten Reduktion der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $285,7 \pm 36,3$  nmol/L unter Kontrollbedingungen auf  $189,9 \pm 25,4$  nmol/L unter Tetracain ( $n=16$  vs.  $n=22$  Zellen aus 2 Patienten,  $P < 0,05$ ). Damit hat das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern also einen eindeutigen Einfluss auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol. In Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus hat Tetracain hingegen einen nur tendenziellen, eindeutig nicht signifikanten Effekt auf die Höhe der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $185,7 \pm 29,0$  nmol/L unter Tetracain vs.  $210,2 \pm 29,0$  nmol/L unter Kontrollbedingungen,  $n=16$  vs.  $n=15$  Zellen aus 2 Patienten), so dass im Sinusrhythmus das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck keinen (bzw. nur einen geringen) Einfluss auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu haben scheint. Insbesondere sind unter Tetracain die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellen mit Vorhofflimmern ( $189,9 \pm 25,4$  nmol/L,  $n=22$ ) und bei Sinusrhythmus ( $185,7 \pm 29,0$  nmol/L,  $n=16$ ) praktisch gleich. Dies zeigt, dass die in Abwesenheit von Tetracain festzustellende pathologische Erhöhung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration tatsächlich auf das bei Vorhofflimmern vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck zurückgeführt werden kann. Diese Resultate sind in Abb. 3.15 gezeigt.



**Abbildung 3.15:** Normalisierung der diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Cytosol von Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern unter Tetracain verglichen mit Sinusrhythmus (Vorhofflimmern/ Kontrolle, n=16; Vorhofflimmern/Tetracain, n=22; Sinusrhythmus/Kontrolle, n=15; Sinusrhythmus/Tetracain, n=16; \* $P < 0,05$ ; n.s.=nicht signifikant).

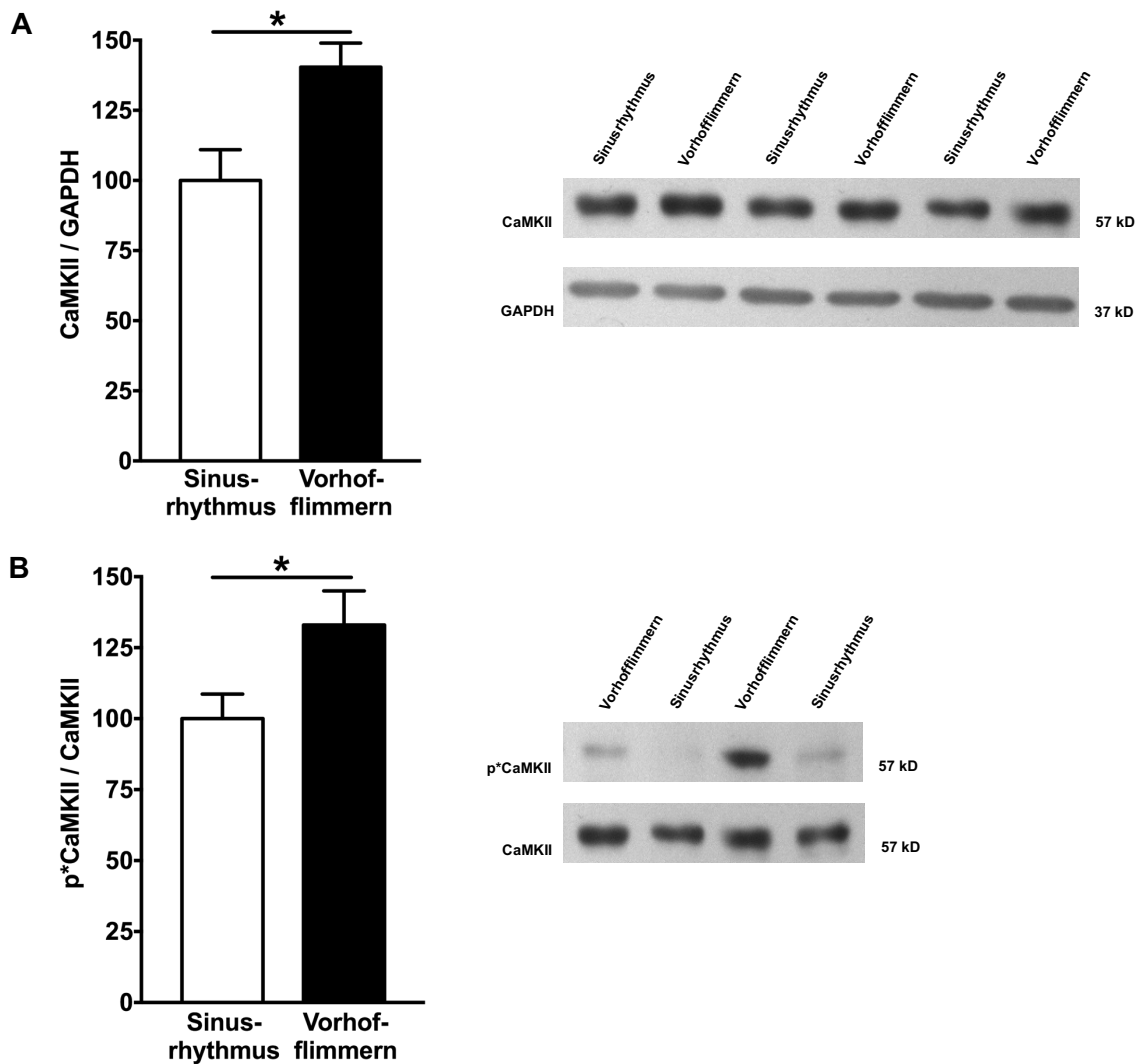
### 3.7 CaMKII-Expression und -Phosphorylierung im humanen atrialen Myokard

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit nimmt die Untersuchung des Einflusses der CaMKII auf den  $Ca^{2+}$ -Stoffwechsel der atrialen Kardiomyozyten eine zentrale Rolle ein. Daher galt es zu prüfen, ob der Herzrhythmus CaMKII-Proteinexpression und -Phosphorylierung beeinflusst. Hierzu wurden Western Blot-Analysen verwendet, welche in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova entstanden sind (siehe Kap. 2.7).

Diese zeigten ein mit  $40 \pm 14\%$  signifikant höheres Proteinexpressionslevel der CaMKII (normalisiert auf GAPDH) in Proben von Patienten mit Vorhofflimmern (n=9) verglichen mit solchen mit Sinusrhythmus (n=11;  $P < 0,05$ ; Abb. 3.16 A). Analog zur Proteinexpression war auch die CaMKII-Phosphorylierung (normalisiert auf die CaMKII-Proteinexpression) bei Vorhofflimmern (n=11) signifikant um  $33 \pm 12\%$  erhöht (vs. Sinusrhythmus, n=13;  $P < 0,05$ , Abb. 3.16 B).



Aus der gesteigerten Phosphorylierung der CaMKII lässt sich darüber hinaus eine gesteigerte Aktivität der Kinase ableiten, wie in Kap. 1.3.2 dargelegt.



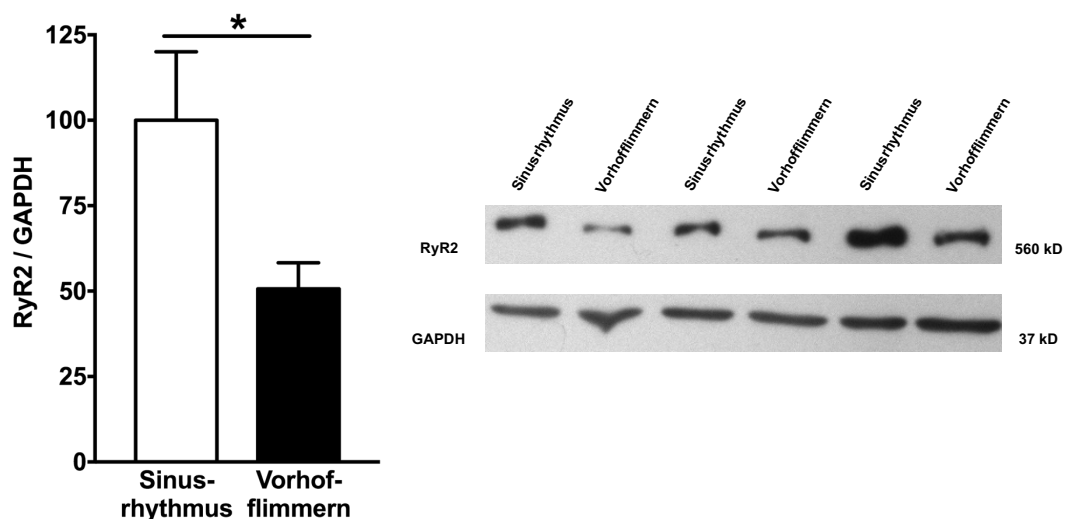
**Abbildung 3.16: CaMKII-Proteinexpression und -Phosphorylierung in humanem Vorhofmyokard bei Vorhofflimmern verglichen mit Sinusrhythmus. A:** Gesteigerte CaMKII-Expression in rechts-atrialem Myokard bei Vorhofflimmern (n=9 vs. Sinusrhythmus, n=11; normalisiert auf GAPDH, \*P<0,05). **B:** Erhöhte CaMKII-Phosphorylierung bei Vorhofflimmern (n=11 vs. Sinusrhythmus, n=13; normalisiert auf CaMKII-Proteinexpression, \*P<0,05). Rechts sind jeweils repräsentative Original-Western Blots abgebildet.

### 3.8 Expressionslevel und Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine des $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts

Im folgenden Kapitel sind Western Blot-Resultate dargestellt, mit denen die Expressionslevel und der Phosphorylierungsstatus von Proteinen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels in Abhängigkeit vom Herzrhythmus untersucht wurden. Diese sind an der elektromechanischen Kopplung beteiligt und werden durch die CaMKII reguliert. Von besonderem Interesse waren hier der kardiale Ryanodinrezeptor RyR2, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums SERCA2a sowie das regulatorische Protein Phospholamban. Die hier dargestellten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova (siehe Kap. 2.7).

#### 3.8.1 Expressionslevel des Ryanodinrezeptors RyR2

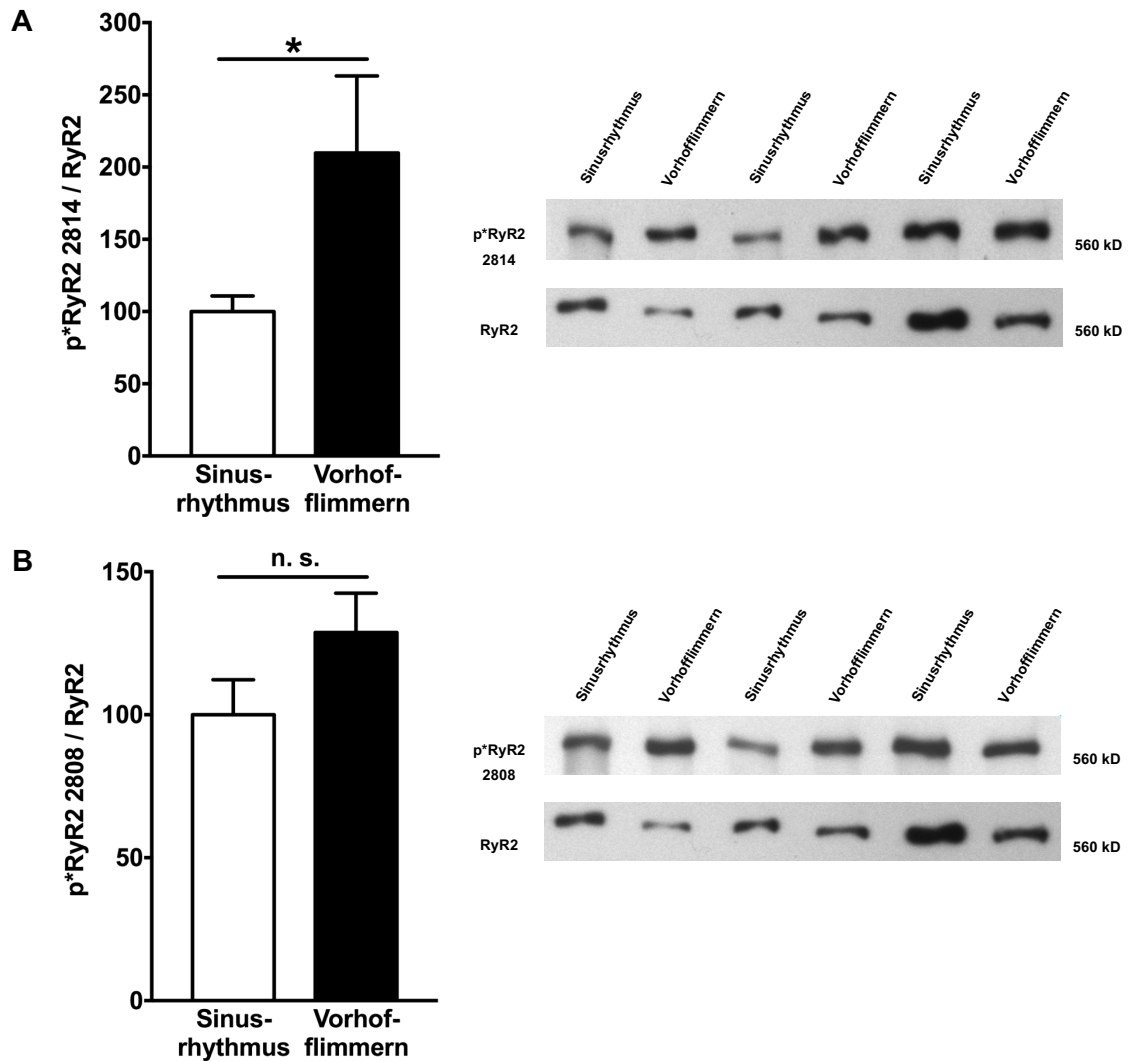
Bei dem Ryanodinrezeptor RyR2 handelt es sich um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal des SR. Wie in Abb. 3.17 illustriert, ergab sich eine signifikant um  $44 \pm 5\%$  reduzierte Expression des RyR2 bei Zellen mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus (jeweils  $n=10$ ;  $P<0,05$ ).



**Abbildung 3.17: Signifikant verminderte Expressionslevel des RyR2 bei Vorhofflimmern** (Vorhofflimmern,  $n=10$  vs. Sinusrhythmus,  $n=10$ ; normalisiert auf GAPDH,  $*P<0,05$ ). Rechts sind repräsentative Original-Western Blots abgebildet.

#### 3.8.2 Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors RyR2 an Ser-2814 und Ser-2808

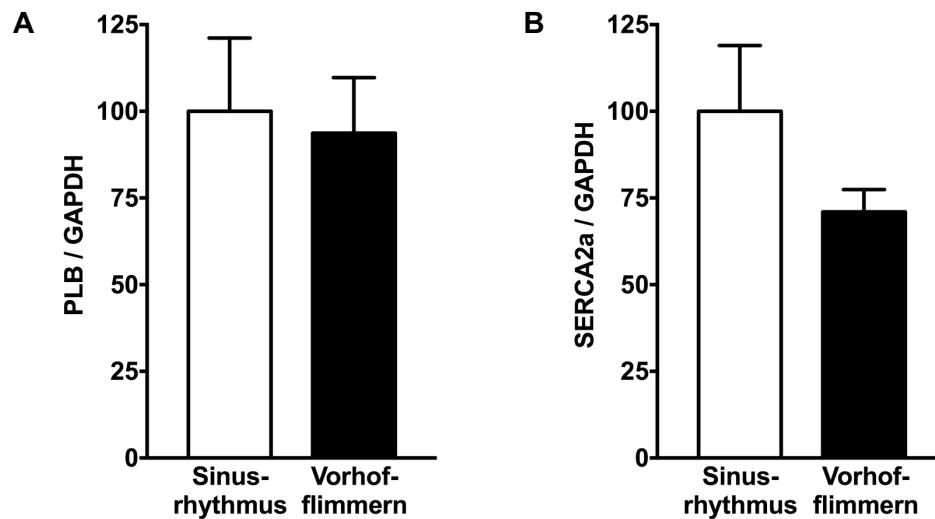
Da die Funktion des RyR2 wesentlich von seinem Phosphorylierungsstatus abhängt, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Phosphorylierungsstatus des RyR2 an Ser-2814 und Ser-2808 untersucht (normalisiert auf die RyR2-Expression). Hier zeigte sich der Phosphorylierungslevel des RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814 signifikant um  $110 \pm 53\%$  erhöht (Vorhofflimmern,  $n=9$  vs. Sinusrhythmus,  $n=10$ ;  $P<0,05$ , Abb. 3.18 A). Auch der Phosphorylierungsgrad von Ser-2808, der PKA-spezifischen Phosphorylierungsstelle, war in der Tendenz um  $29 \pm 14\%$  erhöht, dies war jedoch nicht signifikant (Vorhofflimmern,  $n=9$  vs. Sinusrhythmus,  $n=10$ ;  $P=0,13$ , Abb. 3.18 B).



**Abbildung 3.18: Phosphorylierungsstatus des RyR2 in Abhängigkeit vom Herzrhythmus.** Phosphorylierungsstatus des RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814 (**A**; Vorhofflimmern, n=9 vs. Sinusrhythmus, n=10; \*P<0,05) und an Ser-2808 (**B**; Vorhofflimmern, n=9 vs. Sinusrhythmus, n=10; P=0,13). Rechts sind jeweils repräsentative Original-Western Blots abgebildet.

### 3.8.3 Expression von SERCA2a und Phospholamban

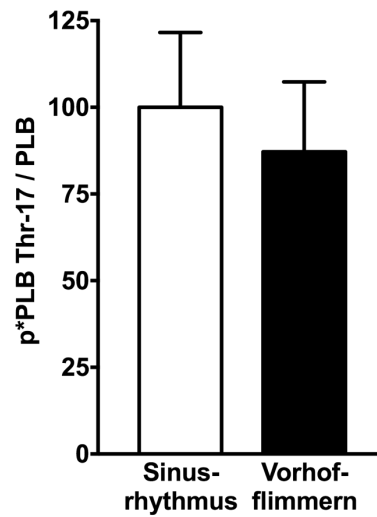
Bei der Expression von SERCA2a und PLB zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in Abhängigkeit vom Herzrhythmus. Die Expression von PLB war bei Vorhofflimmern unverändert ( $94 \pm 27\%$  von Sinusrhythmus; Vorhofflimmern, n=8 vs. Sinusrhythmus, n=9; Abb. 3.19 A). Ebenfalls war die Expression der SERCA2a bei Vorhofflimmern nicht signifikant verändert ( $71 \pm 23\%$  von Sinusrhythmus; Vorhofflimmern, n=8 vs. Sinusrhythmus, n=9; Abb. 3.19 B).



**Abbildung 3.19: Unveränderte Expression von PLB und SERCA2a bei Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus** (jeweils Vorhofflimmern, n=8 vs. Sinusrhythmus, n=9, normalisiert auf GAPDH).

#### 3.8.4 Phospholamban-Phosphorylierung an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle

Im Gegensatz zum RyR2 zeigte sich in den untersuchten Proben die CaMKII-spezifische Phosphorylierung von PLB an Thr-17 bei Vorhofflimmern nicht signifikant verändert ( $87 \pm 20\%$  von Sinusrhythmus; Vorhofflimmern, n=8 vs. Sinusrhythmus, n=9; Abb. 3.20).



**Abbildung 3.20: PLB-Phosphorylierung an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Thr-17 bei Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus** (Vorhofflimmern, n=8 vs. Sinusrhythmus, n=9; normalisiert auf die PLB-Expression).

## 4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation zeigt erstmalig, dass es bei Vorhofflimmern in humanen atrialen Kardiomyozyten CaMKII-abhängig durch Hyperphosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814 zu einem erhöhten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck kommt, welches wiederum zu einem Anstieg der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in diesen Zellen führt. Durch pharmakologische Inhibition der CaMKII kann das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und damit auch die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration komplett normalisiert werden.

Die CaMKII spielt eine wichtige Rolle als Regulator der elektromechanischen Kopplung des Herzens, indem sie diverse Proteine des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels beeinflusst (27, 135). Hierzu zählen unter anderen die RyR2, die SERCA2a (über PLB) und die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (51-55, 58).

Bekannt ist, dass die CaMKII im Rahmen der Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle spielt. So konnten Hoch et al. erstmals zeigen, dass die CaMKII in insuffizientem Ventrikelmuskard stark vermehrt exprimiert wird (136). Die CaMKII-Überexpression führt im insuffizienten ventrikulären Myokard unter anderem zur Hyperphosphorylierung der RyR2. Diese Hyperphosphorylierung führt wiederum zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 und damit zu einem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck (122, 137-139). Das vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck führt wiederum zum Anstieg der diastolischen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wodurch verzögerte Nachdepolarisationen (DAD) entstehen können, wie bereits in Kap. 1.5 näher erläutert. Schlotthauer und Bers konnten im Tiermodell an ventrikulären Kaninchenmyozyten belegen, dass diese DADs ventrikuläre Arrhythmien triggern können (86). Die proarrhythmogenen Wirkungen des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks zeigten sich auch infolge von CaMKII-Überexpression in Mäusen (140).

In atrialen Kardiomyozyten spielt die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR in Form von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks neben anderen Mechanismen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Aktionspotentiale, wodurch bestimmte atriale Kardiomyozyten als Schrittmacherzellen den Herzrhythmus generieren (141). Darüber hinaus konnte in Vorhofmyokardzellen von Katzen nachgewiesen werden, dass durch spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR auch latente atriale Schrittmacherzellen aktiviert werden können, was das

Auftreten von Arrhythmien begünstigt (87, 88).

Damit kann vermutet werden, dass in der atrialen Arrhythmogenese, welche zu Vorhofflimmern führt, auf zellulärer Ebene Anomalien im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt sowie die CaMKII eine wichtige Rolle spielen könnten. Insbesondere wurde spekuliert, dass – wie in ventrikulären Kardiomyozyten – ein vermehrtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck zu einer Erhöhung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen könnte, was depolarisierende Ströme über die Zellmembran und damit Arrhythmien begünstigt. Dies wurde bisher jedoch nicht am humanen Vorhofmyokard untersucht. Daher stellten die Untersuchung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts der humanen atrialen Kardiomyozyten in Sinusrhythmus und Vorhofflimmern sowie der Einfluss der CaMKII auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt die zentralen Säulen meiner Arbeit dar.

### 4.1 Das SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern

Idealtypisch wären die RyR2 während der Diastole komplett geschlossen und würden nur in der Systole (dann vollständig) öffnen. Tatsächlich kommt es jedoch zu spontanen diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR durch spontane Öffnungen einzelner geclusterter RyR2, sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein können (84). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks bedingen das diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck. Dieses wiederum kann je nach Größe des Lecks zu erhöhten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Werten im Cytosol führen. Insbesondere bei pathologischen Veränderungen ist das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck vergrößert.

So konnte für die Herzinsuffizienz bereits wiederholt gezeigt werden, dass ein vermehrtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck sowie eine erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine wichtige Rolle spielen (41, 137, 140). Weit weniger gut wurden bisher jedoch die Rolle von SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und diastolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern untersucht.

Hove-Madsen et al. fanden Hinweise auf ein erhöhtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck auch bei Vorhofflimmern in humanen Vorhofmyozyten (15). Der zugrundeliegende Mechanismus hierfür wurde bisher jedoch nicht hinreichend untersucht, ebenso wenig wie die möglichen Auswirkungen auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich nun eine starke Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks bei



Vorhofflimmern nachweisen. In atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern treten mehr als doppelt so viel  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks auf als in Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus. Auch die jeweilige Größe der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks ist bei Vorhofflimmern signifikant erhöht. Hieraus resultiert ein um das 3,9-fache gesteigertes totales SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern.

Von diesen Ergebnissen ausgehend galt es nun in einem weiteren Schritt meiner Untersuchungen die Frage zu klären, welche Mechanismen zu diesem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern führen.

Zunächst einmal hat der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR einen entscheidenden Einfluss auf das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck, im Sinne eines „leak-load-relationship“: Eine vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR führt unter ansonsten unveränderten Bedingungen zu einem größeren Leck durch die RyR2 (142).

Es stellte sich also die Frage, ob das von mir festgestellte vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch einen vermehrten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bedingt ist oder ob eine vermehrte primäre „Undichtigkeit“ der RyR2 besteht. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des SR der atrialen Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern wurde bereits in der Vergangenheit vermutet, jedoch nicht nachgewiesen. Im Gegenteil wurde von einigen Arbeitsgruppen ein unveränderter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bzw. eine leichte Abnahme desselben im Vergleich zu Sinusrhythmus beschrieben (15, 143, 144). Im Rahmen meiner Arbeit habe ich mittels Koffein-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten den SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bestimmt. Anhand dieser Messungen konnte ich eine vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung als Ursache der vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks ausschließen, tendenziell zeigte sich quantitativ sogar eine Verringerung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung bei Vorhofflimmern, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Um im Rahmen der vorliegenden Dissertation zu überprüfen, ob  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen über die RyR2 die einzige relevante Ursache für das vorhandene SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck sind, wurden atriale Kardiomyozyten mit Tetracain behandelt, welches ein bekannter starker Inhibitor der RyR2 ist und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Austritt aus dem SR über die RyR2 durch Verschluss der Kanäle komplett verhindert (122). Hierdurch wurde das  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR sowohl in Zellen im Sinusrhythmus als auch in Zellen im Vorhofflimmern komplett unterbunden. Daraus ergibt sich, dass die vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks bei Vorhofflimmern tatsächlich durch die RyR2 bzw. deren pathologisch vermehrte diastolische Öffnungswahrscheinlichkeit entstehen. Es blieb damit zu klären, wodurch die erhöhte

Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle beeinflusst wird. In einem Tiermodell für Vorhofflimmern sowie auch in humanem Gewebe wurde bereits zuvor in Einzelkanalmessungen eine erhöhte RyR2-Öffnungswahrscheinlichkeit bei Vorhofflimmern gezeigt (16). Diese gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle kann zwei Ursachen haben. Zum einen kann hier eine gesteigerte Proteinexpression ursächlich sein, zum anderen moduliert die Phosphorylierung des Rezeptors durch verschiedene Kinasen die Öffnungswahrscheinlichkeit.

Um den Einfluss der RyR2 auf das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern näher zu untersuchen, wurden im Rahmen des vorliegenden Projekts Proteinexpressionsanalysen sowie Analysen des Phosphorylierungsstatus der RyR2 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die RyR2-Expression bei Vorhofflimmern signifikant reduziert ist. Dies ist unerwartet, da man bei einer verminderten RyR2-Expression zunächst ein reduziertes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck erwarten könnte.

Die Untersuchungen des RyR2-Phosphorylierungsstatus zeigten jedoch, dass die RyR2 bei Vorhofflimmern stark hyperphosphoryliert sind. Vor allem wurde eine ausgeprägte Hyperphosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser-2814 gefunden, welche spezifisch durch die CaMKII phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an Ser-2808, welches sowohl durch die CaMKII als auch durch die PKA phosphoryliert wird (145), war deutlich weniger ausgeprägt und nicht signifikant gesteigert.

Da somit eine gesteigerte Expression der RyR2 als Ursache für das gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern ausgeschlossen werden kann, scheint die stark gesteigerte Phosphorylierung der Kanäle die führende Ursache für das Leck zu sein. Da die Phosphorylierung der RyR2 durch die PKA an Ser-2808, wofür eine Aktivitätssteigerung des Kanals beschrieben wurde (82, 83), nicht signifikant gesteigert war, schlussfolgere ich, dass die PKA hier nicht der entscheidende Faktor ist. Vielmehr kann in diesem Zusammenhang die Hyperphosphorylierung an Ser-2814 als entscheidende Ursache für die gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 bei Vorhofflimmern angenommen werden.

Bekannt ist, dass die Phosphorylierung der RyR2 an Ser-2814 spezifisch durch die CaMKII erfolgt (54, 55, 59, 137, 145, 146). Hierfür wurde gezeigt, dass sie zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz führt (138, 147, 148); sie stellt sich dabei zunehmend als kritischer Mechanismus heraus, der das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck in insuffizientem ventrikulärem Myokard induziert und zur Herzinsuffizienz beiträgt (42).

## 4.2 Die Rolle der CaMKII für das SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern

Die oben beschriebene CaMKII-spezifische RyR2-Hyperphosphorylierung an Ser-2814 impliziert eine gesteigerte CaMKII-Aktivität bei Vorhofflimmern, der ursächlich mehrere Mechanismen zugrunde liegen können. Zum einen ist eine vermehrte Expression der CaMKII möglich. Zum anderen wurde bereits von mehreren Autoren eine gesteigerte Aktivität der CaMKII durch deren Autophosphorylierung in Abhängigkeit von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beschrieben (27, 43, 44).

Im Rahmen dieses Projekts wurde zunächst mit Hilfe von Proteinexpressionsanalysen die Expression der CaMKII untersucht. Hier zeigte sich eine deutlich signifikant erhöhte Expression der Kinase bei Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus. In einem zweiten Schritt wurde der Phosphorylierungsstatus der CaMKII analysiert. Hierbei wurde analog zur gesteigerten Expression eine signifikant höhere Phosphorylierung des Proteins nachgewiesen, übereinstimmend mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

Aufgrund der bekannten Funktionsmechanismen der CaMKII lässt sich hieraus nunmehr nicht nur eine gesteigerte Aktivität der Kinase aufgrund der vermehrten Expression, sondern durch die gesteigerte Autophosphorylierung ein zusätzlicher Anstieg ihrer Aktivität ableiten, was sich mit den sich aus den Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe um Tessier ergebenden Vermutungen (149) deckt. Die von mir postulierte Hypothese der erhöhten CaMKII-Aktivität wird bestätigt durch die sich in den Proben von Patienten mit Vorhofflimmern zeigende ausgeprägte Hyperphosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814. Diese Befunde konnten mittlerweile durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Chelu bestätigt werden (150).

Neben der CaMKII und den RyR2 wurde im Rahmen der hier durchgeführten Experimente auch die Expression von Phospholamban (PLB) und SERCA2a sowie die Phosphorylierung von PLB untersucht. Die SERCA2a ist ein wichtiges  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprotein, welches  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol durch Aufnahme in das SR eliminiert. PLB wiederum reguliert (inhibiert im unphosphorylierten Zustand) die SERCA2a-Funktion, während es selbst in seiner Funktion durch CaMKII-spezifische Phosphorylierung an Thr-17, aber auch durch PKA-Phosphorylierung an Ser-16, moduliert wird (27). Zu erwarten wäre nach meinen Befunden zur CaMKII eine gesteigerte PLB-Phosphorylierung

an Thr-17 aufgrund der gesteigerten CaMKII-Aktivität bei Vorhofflimmern.

Die Untersuchungen ergaben bezüglich der Expression der beiden Proteine keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus. Tendenziell war die Expression der SERCA2a bei Vorhofflimmern etwas vermindert, während es keine Unterschiede bei PLB gab. Überraschenderweise ergab auch die Analyse des Phosphorylierungsstatus von PLB an Thr-17 keine signifikanten Rhythmus-abhängigen Unterschiede.

Diese interessante Diskrepanz zwischen gesteigerter CaMKII-Aktivität aber relativ unbeeinflusster PLB-Phosphorylierung an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle deutet darauf hin, dass es auf zellulärer Ebene lokale Unterschiede in der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen geben muss. Insgesamt sind die Forschungsergebnisse bezüglich der CaMKII-abhängigen PLB-Phosphorylierung bei Vorhofflimmern bisher uneindeutig. Während Greiser et al. in einem Tiermodell an der Ziege für Vorhofflimmern eine reduzierte Phosphorylierung fanden (143), konnte die Arbeitsgruppe von El-Armouche kongruent zu der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls keine signifikant gesteigerte CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLB in humanem Vorhofmyokard nachweisen. El-Armouche et al. konnten in derselben Studie in Gewebe von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern zwar eine insgesamt gesteigerte Aktivität der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A nachweisen; gleichzeitig demonstrierten sie aber auch, dass die Aktivität von PP1 und PP2A innerhalb der verschiedenen Mikrodomänen der Zellen (im Bereich des SR, des Sarkolemm und der Myofilamente) unterschiedlich ausgeprägt ist. Der Inhibitor I-1 bewirkt eine verringerte PP1-Aktivität im Bereich des SR (151). Eine Aktivitätssteigerung von PP1 und PP2A konnten Greiser et al. im Tiermodell ebenfalls nachweisen (143).

Die Ergebnisse der o.g. Experimente legen damit nahe, dass die Aktivität der SERCA2a bei Vorhofflimmern unverändert ist im Vergleich zu Sinusrhythmus. Da die SERCA2a in humanen Myokardzellen den Großteil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückaufnahme in das SR gewährleistet, erscheint es wahrscheinlich, dass ihre mangelnde Aktivitätssteigerung neben dem erhöhten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck ebenfalls mit dazu beiträgt, dass sich der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bei Vorhofflimmern im Vergleich zu Sinusrhythmus tendenziell verringert, wie die in Kap. 4.1 geschilderten Koffein-Experimente zeigen konnten.

### 4.3 CaMKII-Abhängigkeit des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks von atrialen Kardiomyozyten

Nachdem ich im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt habe, dass das gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck mit der Hyperphosphorylierung der RyR2 bei Vorhofflimmern an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814 korreliert, stellte sich nun die Frage, ob diese Effekte tatsächlich CaMKII-abhängig sind bzw. abschwächbar durch Inhibition der Kinase. Daher wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkmessungen unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 durchgeführt.

Im Rahmen dieser Versuche war festzustellen, dass sich unter CaMKII-Inhibition das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern komplett normalisiert auf Werte, die denen in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus ohne CaMKII-Inhibition vergleichbar sind. Hierdurch konnte die Hypothese, dass die CaMKII-abhängige Hyperphosphorylierung der RyR2 Ursache des gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks ist, weiter bestärkt werden. Auch kann gefolgert werden, dass die CaMKII-Effekte auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel im Rahmen von Vorhofflimmern zumindest teilweise reversibel sind.

Wie bereits in Kap. 4.1 beschrieben, sind bei Vorhofflimmern nicht nur die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz, sondern auch die Größe jedes Sparks deutlich signifikant größer. Die Inhibition der CaMKII konnte die Sparkgröße im Gegensatz zur Sparkfrequenz jedoch interessanterweise nicht wie erwartet reduzieren. Dies deutet darauf hin, dass im Rahmen von Vorhofflimmern noch andere Regulationsmechanismen die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks beeinflussen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die CaMKII-abhängige RyR2-Phosphorylierungsstelle an Ser-2814 die Öffnungsfrequenz der Kanäle und damit die Sparkfrequenz reguliert, während die Sparkgröße von der PKA- und CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle Ser-2808 beeinflusst wird. Um diese Frage abschließend zu beantworten, sind in Zukunft weiterführende Untersuchungen notwendig, die die Effekte der PKA bei Vorhofflimmern näher beleuchten.

Neueste Untersuchungen zur Aktivität der CaMKII deuten darauf hin, dass neben der klassischen Aktivierung der CaMKII durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Autophosphorylierung bei Vorhofflimmern auch die alternative Aktivierung der CaMKII durch Oxidation an Met-281/282 eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt (152). Andere aktuelle Studien zeigen weitere alternative Aktivierungswege der CaMKII durch Glykosylierung an Ser-279, was im diabetischen Tiermodell zu Arrhythmien als Antwort auf

Hyperglykämien führte, (49) sowie durch Nitrosylierung durch NO (50). Die mögliche Rolle dieser CaMKII-Aktivierungswege speziell bei Vorhofflimmern wurde jedoch noch nicht weiter erforscht.

Im Rahmen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkmessungen unter CaMKII-Inhibition konnte auch in Kardiomyozyten von Patienten im Sinusrhythmus durch Inhibition der CaMKII eine zwar schwach ausgeprägte, aber signifikante weitere Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz und damit des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 in atrialen Kardiomyozyten generell CaMKII-abhängig sind, auch unter physiologischen Konditionen im Sinusrhythmus. Besonders ausgeprägt ist die CaMKII-Abhängigkeit des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks aber im Kontext pathologisch vermehrter CaMKII-Aktivität und CaMKII-abhängiger RyR2-Hyperphosphorylierung bei Vorhofflimmern. Dies wird belegt durch die besonders drastische Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz und damit des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks durch CaMKII-Inhibition in Vorhofmyokardzellen von Patienten mit Vorhofflimmern.

### **4.4 Auswirkungen des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks auf die diastolische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Ausgehend von der Feststellung, dass Vorhofflimmern mit einem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch die RyR2 vergesellschaftet ist, stellte sich die Frage, ob dies ein reines Epiphänomen ist oder ob der vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Austritt aus dem SR auch funktionelle Konsequenzen in den Kardiomyozyten hat. Es wurde bereits spekuliert, dass die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern erhöht sein könnte (3). Dies wurde bisher aber nicht in humanen Vorhofmyokardzellen untersucht.

Daher wurden im Rahmen meiner Dissertation die Auswirkungen des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Hilfe von Epifluoreszenzmessungen quantitativ untersucht. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in atrialen Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern in der Tat signifikant erhöht ist im Vergleich zu Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus.

Um nunmehr die Frage zu beantworten, ob diese Erhöhung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration tatsächlich auf das vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck über die RyR2

zurückzuführen ist, wurden Epifluoreszenzmessungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Blockade der RyR2 mit Tetracain durchgeführt. Hierdurch konnte nicht nur wie in Kap. 4.1 geschildert das  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR komplett unterbunden werden, sondern vielmehr auch die erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern auf Werte wie bei Kardiomyozyten im Sinusrhythmus normalisiert werden. Demgegenüber hatte Tetracain bei Zellen im Sinusrhythmus keinen signifikanten Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Daraus kann zum einen geschlossen werden, dass die erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration allein durch das deutlich gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern verursacht wird. Zum anderen hat das geringe SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck unter physiologischen Konditionen im Sinusrhythmus offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Möglicherweise kann der quantitativ geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusionsmechanismus der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase das geringe diastolische Leck im Sinusrhythmus hinsichtlich der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration komplett kompensieren, während er mit einem höheren SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck, wie beim Vorhofflimmern, überlastet ist.

### 4.5 CaMKII-Abhängigkeit der erhöhten diastolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern

Ist nun aber auch die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration CaMKII-abhängig?

Ich konnte bereits zeigen, dass das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern durch CaMKII-Inhibition vollständig normalisiert werden kann. Epifluoreszenzmessungen unter CaMKII-Inhibition zeigten hierzu kongruent die Normalisierung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern auf Werte vergleichbar mit denen bei Sinusrhythmus. Auf der anderen Seite führt die Inhibition der CaMKII in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus, in denen das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck ja bereits gering ist, trotz einer signifikanten weiteren Verringerung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks zu keiner weiteren Reduktion der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies passt zu den bereits diskutierten Befunden aus den Tetracain-Versuchen, in welchen eine komplette Ablation des (geringen) SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks bei Zellen im Sinusrhythmus keinen Einfluss auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hatte.

Da die CaMKII auch die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle reguliert (58, 153), wirkt sich eine Inhibition der CaMKII auch auf deren Funktion aus. In ventrikulären Kardiomyozyten konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine CaMKII-Inhibition zur Reduktion des Stroms  $I_{\text{Ca,L}}$  über die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt (147, 153, 154). Die Arbeitsgruppe um Christ hat gezeigt, dass dies analog auch für rechtsatriale Myokardzellen im Sinusrhythmus gilt, jedoch im Vorhofflimmern aus einer CaMKII-Inhibition keine weitere Reduktion des bereits verringerten  $I_{\text{Ca,L}}$  resultiert (155).

Denkbar wäre also, dass der Einfluss der CaMKII auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vielmehr durch die Effekte auf den  $I_{\text{Ca,L}}$  vermittelt wird, denn über das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck. Um dies zu überprüfen, wurde in mit meiner Dissertation assoziierten Untersuchungen mittels Patch Clamp-Technik der Effekt der CaMKII-Inhibition auf den  $I_{\text{Ca,L}}$  untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz zu Sinusrhythmus bei Vorhofflimmern der bereits verminderte  $I_{\text{Ca,L}}$  durch Inhibition der CaMKII nicht weiter reduziert wird (156).

Dies bekräftigt noch einmal die Hypothese, dass das CaMKII-vermittelte gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck die Hauptursache für die erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Vorhofflimmern ist.

Weiterhin konnte dabei ebenso wie in Arbeiten von Lenaerts et al. gezeigt werden, dass bei Vorhofflimmern die NCX-Funktion leicht erhöht ist, während die NCX-Expression signifikant erhöht ist (144). Man kann vermuten, dass es sich hierbei um einen Kompensationsmechanismus bei erhöhten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen handelt, welcher die freie cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration senken soll, jedoch aufgrund des permanenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks aus dem SR nicht suffizient ist.

### **4.6 Das CaMKII-abhängige SR $\text{Ca}^{2+}$ -Leck als potentiell arrhythmogenes Substrat**

Ein erhöhtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und damit eine erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie sie bei Vorhofflimmern in atrialen Kardiomyozyten vorliegen, werden als ein potentieller arrhythmogener Mechanismus angesehen:

Wie bereits geschildert, führt ein gesteigerter Austritt von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR zu einer



erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol. Dies wiederum steigert auch die Elimination von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle, bei humanen Kardiomyozyten insbesondere über den NCX, von welchem in einem mit meiner Arbeit assoziierten Projekt gezeigt wurde, dass seine Aktivität bei Vorhofflimmern erhöht ist. Dies führt zur Depolarisation der Zelle durch einen einwärtsgerichteten Strom, was DADs verursachen kann. Bei einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird die Depolarisation entsprechend verstärkt. Dieser Sachverhalt wurde bereits von Song et al. in Ventrikelfibrozyten von Meerschweinchen nachgewiesen (157). Auch haben Experimente an Pulmonalvenen von Hunden gezeigt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Triggeraktivität, welche zu DADs führt, eine Ektopie bewirken kann (158).

Darüber hinaus wurde von Sood et al. bei transgenen Mäusen mit FKBP12.6-Defizienz und daraus resultierendem gesteigertem SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck nachgewiesen, dass diese anfälliger für die Induktion von Vorhofflimmern sind (101). Auch haben Mäuse mit einer CaMKII $\delta_{\text{C}}$ -Überexpression eine erhöhte Neigung zu Arrhythmien (140). Ob diese CaMKII $\delta_{\text{C}}$ -Überexpression jedoch auch zu Vorhofflimmern führt, ist bisher nicht untersucht worden.

Insbesondere weist die oben erwähnte Studie von Chelu et al. auf die Relevanz des CaMKII-abhängigen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks über die RyR2 für die Induktion von Vorhofflimmern hin. Hier wurden Knock-in-Mäuse untersucht, welche einen nicht durch die CaMKII phosphorylierbaren RyR2 aufweisen. Diese waren im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen resistent gegen die Pacing-induzierte Entstehung von Vorhofflimmern, was darauf hindeutet, dass die Hyperphosphorylierung der RyR2 durch die CaMKII und das hierdurch gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck ein kritischer Mechanismus bei der Entstehung von Vorhofflimmern sind (150).

Ich schlussfolgere deswegen, dass das CaMKII-abhängige gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern verursacht durch die Hyperphosphorylierung der RyR2 ein wichtiger arrhythmogener Mechanismus ist und dass eine Inhibition der CaMKII die Neigung zu Vorhoffarrhythmien reduzieren kann. Daher könnte die CaMKII ein neues therapeutisches pharmakologisches Ziel für noch zu entwickelnde Antiarrhythmika bieten.

Auch die Feststellung, dass CaMKII-Inhibition den  $I_{\text{Ca,L}}$  bei Vorhofflimmern nicht noch weiter reduziert, ist bezüglich möglicher therapeutischer Ansätze äußerst wichtig. Denn dies bedeutet, dass CaMKII-Inhibition zielgerichtet gegen einen arrhythmogenen Mechanismus, nämlich das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck, wirken kann, ohne einen anderen weiter zu aggravieren – denn eine weitere Reduktion des  $I_{\text{Ca,L}}$  würde die Dauer des

Aktionspotentials weiter verkürzen, was wiederum dadurch proarrhythmogen wirken würde, dass Reentry-Mechanismen begünstigt werden. Hier spielen wiederum die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von El-Armouche eine wichtige Rolle. Die Tatsache, dass die Aktivität der Proteinphosphatasen bei Vorhofflimmern in subzellulären Kompartimenten unterschiedlich reguliert wird (151), führt dazu, dass die Inhibition der CaMKII sehr spezifisch auf das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck wirken kann ohne signifikante Effekte im Bereich des Sarkolemm.

### 4.7 Limitationen der Arbeit

Es muss erwähnt werden, dass unter in vivo-Gegebenheiten die Herzfrequenz eine wichtige Rolle in Hinblick auf CaMKII-Effekte spielt, da die CaMKII frequenzabhängig aktiviert werden kann (59). Diese Störgröße besteht bei den Versuchsbedingungen meiner Untersuchungen nicht, da die Kardiomyozyten aus beiden Gruppen mit den gleichen Frequenzen elektrisch stimuliert wurden. Vielmehr dürften dementsprechend die Resultate der vorliegenden Dissertation die CaMKII-abhängigen Effekte in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern sogar noch unterschätzt haben, weil die Zellen der Gruppe mit Vorhofflimmern eben nicht wie in vivo mit einer höheren Frequenz erregt wurden, als die Zellen im Sinusrhythmus.

Aufgrund der Methodik von  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Messungen konnten nur solche Zellen bezüglich ihres SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks analysiert werden, welche zum Messzeitpunkt auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks aufwiesen. Einer der Effekte der CaMKII-Inhibition im Rahmen meiner Arbeit war, dass der prozentuale Anteil an Zellen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks aufwiesen, beträchtlich reduziert wurde. Dies bedeutet, dass der tatsächliche Effekt der CaMKII-Inhibition auf das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern wahrscheinlich sogar noch stärker ist, als die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen.

Auch soll an dieser Stelle festgehalten werden, dass hier die CaMKII zur Untersuchung mechanistischer Fragestellungen nur akut inhibiert wurde. Chronische Effekte der CaMKII-Inhibition, wie Veränderungen der Transkriptionslevel von Proteinen, die in die elektromechanische Kopplung involviert sind, konnten in diesem Versuchsszenario weder untersucht noch ausgeschlossen werden. Hinsichtlich eines möglichen

therapeutischen Einsatzes von CaMKII-Inhibitoren müssen diese möglichen sekundären Effekte berücksichtigt werden.

### **4.8 Ausblick und klinische Relevanz – CaMKII-Inhibition als mögliche antiarrhythmische Therapie bei Vorhofflimmern?**

Es konnte gezeigt werden, dass die CaMKII-abhängige Hyperphosphorylierung der RyR2 zu einem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Vorhofflimmern führt. Dies wiederum führt zu einer erhöhten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol, was ein arrhythmogenes Substrat darstellt. Daher sollte die CaMKII-Inhibition weiter erforscht werden in Hinblick auf mögliche neue antiarrhythmische Strategien und Therapien bei Vorhofflimmern.

Bezüglich etablierter pharmakologischer Therapien können die hier präsentierten Ergebnisse möglicherweise einen Teil der antiarrhythmischen Effekte von  $\beta$ -Blockern erklären, welche der CaMKII vorgeschaltet wirken und von denen gezeigt werden konnte, dass sie die Hyperphosphorylierung der RyR2 reduzieren und das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck verringern (159, 160). In jüngerer Vergangenheit konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl der  $\beta$ -Blocker Carvedilol als auch das Klasse Ic-Antiarrhythmikum Flecainid direkt an die RyR2 binden und diese hemmen (161, 162). Zumindest Flecainid wirkt jedoch auch auf diverse atriale  $\text{K}^{+}$ -Ströme, was wiederum proarrhythmisch wirken kann (163).

Die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks oder direkter spezifischer RyR2-Inhibitoren sollte vorangetrieben werden und stellt möglicherweise einen neuartigen Angriffspunkt in der Therapie des Vorhofflimmerns dar, das in seiner medizinischen Relevanz und sozioökonomischen Bedeutung stetig zunimmt.

Insbesondere spezifische CaMKII-Inhibitoren als mögliche antiarrhythmische Substanzen bedürfen in Zukunft weiterer experimenteller und klinischer Studien. Da die CaMKII allerdings als ubiquitäre Kinase in vielen verschiedenen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, könnte eine systemische CaMKII-Inhibition auch ganz unterschiedliche unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen. Hier ist insbesondere zu beachten, dass das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch CaMKII-Inhibition auch im

Sinusrhythmus reduziert wird. Lakatta et al. zeigten bereits, dass das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck eine wichtige Rolle in der Rhythmogenese des Sinusknotens spielt (164). Denkbar wäre also, dass therapeutische CaMKII-Inhibitoren die Sinusknotenfunktion beeinflussen könnten, am ehesten im Sinne von Sinusbradykardien.

In der jüngsten Vergangenheit wurden neue hoch selektive CaMKII-Inhibitoren entwickelt, speziell konzipiert für einen möglichen therapeutischen Einsatz. Die oral bioverfügbare niedermolekulare Substanz SMP-114 („Rimacalib“) wurde initial als Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis entwickelt und als solches bereits in einer klinischen Phase II-Studie getestet, allerdings anscheinend mit unzureichender Effektivität. Jüngst veröffentlichte in vitro-Untersuchungen der Effekte dieser Substanz auf humane atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten zeigten eine signifikante Reduktion des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks und des Auftretens von arrhythmogenen spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen ohne negative Auswirkungen auf die elektromechanische Kopplung der untersuchten Kardiomyozyten (76). Ebenso konnte in in vitro-Experimenten mit GS-680 und AS100105 gezeigt werden, dass diese Substanzen signifikant das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck reduzieren und konsekutiv die arrhythmogene Aktivität in atrialen Kardiomyozyten durch die Verringerung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks senken (77, 78). Bei allen genannten Wirkstoffen stehen klinische Studien zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

Trotzdem geben diese Veröffentlichungen Anlass zu der Annahme, dass in näherer Zukunft erste CaMKII-Inhibitoren Anwendung in der antiarrhythmischen Therapie von Vorhofflimmern finden könnten.

## 5 Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die häufigste behandlungsbedürftige Herzrhythmusstörung und wichtige Ursache kardialer Morbidität und Mortalität. Bei Vorhofflimmern kommt es zu tiefgreifenden Veränderungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel der atrialen Kardiomyozyten, welche als mitursächlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung angesehen werden. Ein zentraler Regulator des kardiomyozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts ist die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Ausgangshypothese der hier vorliegenden Arbeit war es, dass bei Vorhofflimmern ein vermehrtes CaMKII-abhängiges SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck infolge von Überexpression und Überaktivierung der CaMKII auftritt.

Diese Hypothese wurde untersucht in humanen rechtsatrialen Kardiomyozyten, gewonnen aus Gewebeproben von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Kontrollproben von Patienten im Sinusrhythmus. Dabei wurde in isolierten Kardiomyozyten das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch die konfokale fluoreszenzmikroskopische Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks sowie die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels ratiometrischer Epifluoreszenzmessungen bestimmt. Parallel wurden proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten eine vermehrte Expression und Aktivierung (durch Autophosphorylierung) der CaMKII und damit assoziiert eine Hyperphosphorylierung des RyR2, dem SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal, an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814 bei Vorhofflimmern. Damit einhergehend zeigte sich ein vielfach erhöhtes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck. Es konnte gezeigt werden, dass dieses CaMKII-abhängig ist; durch Inhibition der CaMKII mittels KN-93 konnte es vollständig auf das Niveau bei Sinusrhythmus reduziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass das SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck für die ebenfalls festgestellte starke Erhöhung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verantwortlich ist, da diese durch Tetracain komplett normalisiert werden konnte. Ebenso konnte diese Erhöhung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch CaMKII-Inhibition vollständig normalisiert werden.

Die Ergebnisse zeigen damit erstmalig, dass es bei Vorhofflimmern in humanen atrialen Kardiomyozyten CaMKII-abhängig durch Hyperphosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2814 zu einem erhöhten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck kommt, welches wiederum zum Anstieg der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in diesen Zellen führt. Vermutlich führen durch den NCX bedingte transiente

Einwärtsströme zu späten Nachdepolarisationen, die Vorhofflimmern initiieren können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen damit nahe, dass das CaMKII-abhängige SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck ein dem Vorhofflimmern zugrunde liegender arrhythmogener Mechanismus ist und dass die Inhibition der CaMKII ein neuartiger pharmakotherapeutischer Ansatz bei Vorhofflimmern sein könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huezey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(11):e101-98.
2. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH, Jr., Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014;129(8):837-47.
3. Dobrev D. Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz*. 2006;31(2):108-12.
4. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002;415(6868):219-26.
5. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med*. 1995;155(5):469-73.
6. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA*. 1994;271(11):840-4.
7. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998;98(10):946-52.
8. Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln (DE): Herold. 2018.
9. Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, Sr., Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ, Levy D, Wolf PA, Benjamin EJ. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA*. 2004;291(23):2851-5.
10. Mahida S, Ellinor PT. New advances in the genetic basis of atrial fibrillation. *J*

- Cardiovasc Electrophysiol. 2012;23(12):1400-6.
11. Mahida S, Lubitz SA, Rienstra M, Milan DJ, Ellinor PT. Monogenic atrial fibrillation as pathophysiological paradigms. *Cardiovasc Res.* 2011;89(4):692-700.
12. Statistisches Bundesamt (DE). Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen 2018 [Internet]. 2018 [cited 2018 April 15]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html>.
13. Hart RG, Halperin JL. Atrial fibrillation and stroke: concepts and controversies. *Stroke.* 2001;32(3):803-8.
14. Camm J. Antiarrhythmic drugs for the maintenance of sinus rhythm: risks and benefits. *Int J Cardiol.* 2012;155(3):362-71.
15. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genis A, Roura S, Rodriguez Font E, Aris A, Cinca J. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation.* 2004;110(11):1358-63.
16. Vest JA, Wehrens XH, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, Danilo P, Ravens U, Rosen MR, Marks AR. Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation.* 2005;111(16):2025-32.
17. Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol.* 1883;4(1):29-42.3.
18. Ringer S, Buxton DW. Concerning the action of small quantities of calcium, sodium, and potassium salts upon the vitality and function of contractile tissue and the cuticular cells of fishes. *J Physiol.* 1885;6(4-5):154-61.
19. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2ed edition. Dordrecht (NL): Kluwer Academic Press. 2001.
20. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Twitch-dependent SR  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1993;265(2 Pt 1):C533-40.
21. Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, Bassani JW, Qi M, Ginsburg KS, Samarel AM, Bers DM. Cardiac myocyte volume,  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):H2425-35.
22. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983;245(1):C1-14.
23. Fabiato A. Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac



- Purkinje cell. *J Gen Physiol.* 1985;85(2):291-320.
24. Fabiato A, Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol.* 1975;249(3):469-95.
25. Bers DM, Guo T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1047:86-98.
26. Zalk R, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:367-85.
27. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):919-39.
28. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205.
29. Kirk MM, Izu LT, Chen-Izu Y, McCulle SL, Wier WG, Balke CW, Shorofsky SR. Role of the transverse-axial tubule system in generating calcium sparks and calcium transients in rat atrial myocytes. *J Physiol.* 2003;547(Pt 2):441-51.
30. Dobrev D, Nattel S. Calcium handling abnormalities in atrial fibrillation as a target for innovative therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;52(4):293-9.
31. Walden AP, Dibb KM, Trafford AW. Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(4):463-73.
32. Dobrev D, Teos LY, Lederer WJ. Unique atrial myocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(4):448-51.
33. Boknik P, Unkel C, Kirchhefer U, Kleideiter U, Klein-Wiele O, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Schmitz W, Vahlensieck U, Zimmermann N, Jones LR, Neumann J. Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovasc Res.* 1999;43(1):67-76.
34. Tanaami T, Ishida H, Seguchi H, Hirota Y, Kadono T, Genka C, Nakazawa H, Barry WH. Difference in propagation of  $\text{Ca}^{2+}$  release in atrial and ventricular myocytes. *Jpn J Physiol.* 2005;55(2):81-91.
35. Maier LS, Barckhausen P, Weisser J, Aleksic I, Baryalei M, Pieske B.  $\text{Ca}^{2+}$  handling in isolated human atrial myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(3):H952-8.
36. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res.*

- 2014;114(9):1483-99.
37. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417-45.
38. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1221(1):89-101.
39. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 1989;264(30): 17907-12.
40. Srinivasan M, Edman CF, Schulman H. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol.* 1994;126(4):839-52.
41. Zhang T, Brown JH. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2004;63(3):476-86.
42. Neef S, Maier LS. Novel aspects of excitation-contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(4):360.
43. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science.* 1992;256(5060):1199-202.
44. Lai Y, Nairn AC, Greengard P. Autophosphorylation reversibly regulates the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependence of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(12):4253-7.
45. Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H. Activation of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(24):9497-501.
46. Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Reversible generation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent form of  $\text{Ca}^{2+}$ (calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem.* 1986;261(19):8581-4.
47. Heijman J, Voigt N, Wehrens XH, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Front Pharmacol.* 2014;5:30.
48. Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 2008;133(3):462-74.

49. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013;502(7471):372-6.
50. Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E. NO-dependent CaMKII activation during beta-adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 2013;100(3):392-401.
51. Xu A, Hawkins C, Narayanan N. Phosphorylation and activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1993;268(12):8394-7.
52. Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG. Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 1983;258(22):13587-91.
53. Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry*. 1979;18(23):5150-7.
54. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*. 1995;270(5):2074-81.
55. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*. 1991;266(17):11144-52.
56. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac  $\text{Na}^{+}$  channels. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3127-38.
57. Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM, Maier LS. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2(3):285-94.
58. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol*. 2000;2(3):173-7.
59. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent

- protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res*. 2004;94(6):e61-70.
60. Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol*. 2014;5:101.
61. Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(1):H249-55.
62. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(8):975-84.
63. Wagner S, Maier LS. Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents by CaM and CaMKII. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17 Suppl 1:S26-S33.
64. Schulman H, Hanson PI, Meyer T. Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium*. 1992;13(6-7):401-11.
65. Maier LS, Bers DM. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2007;73(4):631-40.
66. Pellicena P, Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol*. 2014;5:21.
67. Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM. The effect of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol*. 1997;501 ( Pt 1):17-31.
68. Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H. The newly synthesized selective Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181(3):968-75.
69. Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, Sung RJ. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287(3):996-1006.
70. Gao L, Blair LA, Marshall J. CaMKII-independent effects of KN-93 and its inactive analog KN-92: reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(4):1606-10.
71. Rezazadeh S, Claydon TW, Fedida D. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-

- methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(1):292-9.
72. Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4315-20.
  73. Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212(3):806-12.
  74. Braun AP, Schulman H. A non-selective cation current activated via the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *J Physiol.* 1995;488 ( Pt 1):37-55.
  75. Wu Y, Gao Z, Chen B, Koval OM, Singh MV, Guan X, Hund TJ, Kutschke W, Sarma S, Grumbach IM, Wehrens XH, Mohler PJ, Song LS, Anderson ME. Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(14):5972-7.
  76. Neef S, Mann C, Zwenger A, Dybkova N, Maier LS. Reduction of SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak and arrhythmogenic cellular correlates by SMP-114, a novel CaMKII inhibitor with oral bioavailability. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(4):45.
  77. Neef S, Steffens A, Pellicena P, Mustroph J, Lebek S, Ort KR, Schulman H, Maier LS. Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;115:73-81.
  78. Lebek S, Plossl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lucht CM, Schopka S, Florchinger B, Schmid C, Zausig Y, Pagratis N, Marchand B, Koltun DO, Hung WK, Ahmadyar S, Belardinelli L, Maier LS, Wagner S. The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;118:159-68.
  79. Inui M, Saito A, Fleischer S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem.* 1987;262(32):15637-42.
  80. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events

- underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 1993;262(5134):740-4.
81. Guatimosim S, Dilly K, Ferno Santana L, Saleet Jafri M, Sobie EA, Lederer WJ. Local  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and EC coupling in heart:  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and the regulation of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(8):941-50.
82. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101(4):365-76.
83. Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosemblyt N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*. 2003;113(7):829-40.
84. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1491-545.
85. Wehrens XH. CaMKII regulation of the cardiac ryanodine receptor and sarcoplasmic reticulum calcium release. *Heart Rhythm*. 2011;8(2):323-5.
86. Schlotthauer K, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ Res*. 2000;87(9):774-80.
87. Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol*. 2000;524 Pt 2:415-22.
88. Lipsius SL, Hüser J, Blatter LA. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release sparks atrial pacemaker activity. *News Physiol Sci*. 2001;16:101-6.
89. Aienza F, Martins RP, Jalife J. Translational research in atrial fibrillation: a quest for mechanistically based diagnosis and therapy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5(6):1207-15.
90. Comtois P, Kneller J, Nattel S. Of circles and spirals: bridging the gap between the leading circle and spiral wave concepts of cardiac reentry. *Europace*. 2005;7 Suppl 2:10-20.
91. Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2011;121(8):2955-68.
92. Dobrev D, Nattel S. New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *Lancet*. 2010;375(9721):1212-23.

93. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J*. 2012;33(15):1870-7.
94. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation*. 1995;91(5):1588-95.
95. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995;92(7):1954-68.
96. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents and human atrial fibrillation. *Circ Res*. 1999;85(5):428-36.
97. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;44(1):121-31.
98. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;81(4):512-25.
99. Beavers DL, Wang W, Ather S, Voigt N, Garbino A, Dixit SS, Landstrom AP, Li N, Wang Q, Olivetto I, Dobrev D, Ackerman MJ, Wehrens XHT. Mutation E169K in junctophilin-2 causes atrial fibrillation due to impaired RyR2 stabilization. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(21):2010-9.
100. King JH, Zhang Y, Lei M, Grace AA, Huang CL, Fraser JA. Atrial arrhythmia, triggering events and conduction abnormalities in isolated murine RyR2-P2328S hearts. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207(2):308-23.
101. Sood S, Chelu MG, van Oort RJ, Skapura D, Santonastasi M, Dobrev D, Wehrens XHT. Intracellular calcium leak due to FKBP12.6 deficiency in mice facilitates the inducibility of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2008;5(7):1047-54.
102. Zhabyeyev P, Hiess F, Wang R, Liu Y, Wayne Chen SR, Oudit GY. S4153R is a gain-of-function mutation in the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  release channel ryanodine receptor associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Can J Cardiol*. 2013;29(8):993-6.
103. Logan WF, Rowlands DJ, Howitt G, Holmes AM. Left Atrial Activity Following Cardioversion. *Lancet*. 1965;2(7410):471-3.

104. Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Come PC, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS. Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23(7):1535-40.
105. Daoud EG, Marcovitz P, Knight BP, Goyal R, Man KC, Strickberger SA, Armstrong WF, Morady F. Short-term effect of atrial fibrillation on atrial contractile function in humans. *Circulation*. 1999;99(23):3024-7.
106. Leistad E, Aksnes G, Verburg E, Christensen G. Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation*. 1996;93(9):1747-54.
107. Sun H, Gaspo R, Leblanc N, Nattel S. Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*. 1998;98(7):719-27.
108. Boyden PA, Tilley LP, Albala A, Liu SK, Fenoglio JJ, Jr., Wit AL. Mechanisms for atrial arrhythmias associated with cardiomyopathy: a study of feline hearts with primary myocardial disease. *Circulation*. 1984;69(5):1036-47.
109. Boyden PA, Tilley LP, Pham TD, Liu SK, Fenoglio JJ, Jr., Wit AL. Effects of left atrial enlargement on atrial transmembrane potentials and structure in dogs with mitral valve fibrosis. *Am J Cardiol*. 1982;49(8):1896-908.
110. Boyden PA, Hoffman BF. The effects on atrial electrophysiology and structure of surgically induced right atrial enlargement in dogs. *Circ Res*. 1981;49(6):1319-31.
111. Ausma J, Dispersyn GD, Duimel H, Thone F, Ver Donck L, Allessie MA, Borgers M. Changes in ultrastructural calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(3):355-64.
112. Everett TH, Li H, Mangrum JM, McRury ID, Mitchell MA, Redick JA, Haines DE. Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;102(12):1454-60.
113. Vitadello M, Ausma J, Borgers M, Gambino A, Casarotto DC, Gorza L. Increased myocardial GRP94 amounts during sustained atrial fibrillation: a protective response? *Circulation*. 2001;103(17):2201-6.
114. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997;96(4):1180-4.
115. Thiedemann KU, Ferrans VJ. Left atrial ultrastructure in mitral valvular disease.



- Am J Pathol. 1977;89(3):575-604.
116. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100(1):87-95.
  117. Wouters L, Liu GS, Flameng W, Thijssen VL, Thone F, Borgers M. Structural remodeling of atrial myocardium in patients with cardiac valve disease and atrial fibrillation. *Exp Clin Cardiol*. 2001;5:158-63.
  118. Hobbs WJ, Fynn S, Todd DM, Wolfson P, Galloway M, Garratt CJ. Reversal of atrial electrical remodeling after cardioversion of persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation*. 2000;101(10):1145-51.
  119. Yu WC, Lee SH, Tai CT, Tsai CF, Hsieh MH, Chen CC, Ding YA, Chang MS, Chen SA. Reversal of atrial electrical remodeling following cardioversion of long-standing atrial fibrillation in man. *Cardiovasc Res*. 1999;42(2):470-6.
  120. Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS. Temporal dependence of the return of atrial mechanical function on the mode of cardioversion of atrial fibrillation to sinus rhythm. *Am J Cardiol*. 1995;75(8):624-6.
  121. Strukturformel Koffein [Image on the internet]. 2012 [cited 2018 April 08]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caffeina\\_struttura.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caffeina_struttura.svg).
  122. Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res*. 2007;100(3):391-8.
  123. Strukturformel Tetracain [Image on the internet]. 2014 [cited 2018 April 08]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-\(dimethylamino\)ethyl\\_4-\(butylamino\)benzoate\\_200.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-(dimethylamino)ethyl_4-(butylamino)benzoate_200.svg).
  124. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):910-9.
  125. IonOptix. Myocyte Calcium & Contractility Recording System ( $\mu$ Step Configuration) [PDF on the internet]. 2011 [30.10.2018]. Available from: [http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont\\_HSW\\_digital.pdf](http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf).
  126. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*. 1982;94(2):325-34.
  127. Ladilov YV, Siegmund B, Balser C, Piper HM. Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res*. 1997;80(1):69-

- 75.
128. Thermo Fisher Scientific (US). Molecular Probes™ Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11<sup>th</sup> edition (2010), Chapter 19: Indicators for Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and other metal ions [PDF on the internet]. 2010 [cited 2018 October 29]. Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/Molecular%20Probes%20Handbook/chapter-pdfs/Ch-19-Ca-Mg-Zn-Ion-Indicators.pdf?icid=WE216841>.
  129. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-50.
  130. Gollnick FW, S.Y.; Meyer, R. Effect of experimental parameters on quantitative Fura-2 measurements. *Pflügers Arch*. 1992;420:Suppl. 1: R142.
  131. Li Q, Altschuld RA, Stokes BT. Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;147(1):120-6.
  132. Kao JP, Tsien RY. Ca<sup>2+</sup> binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophys J*. 1988;53(4):635-9.
  133. Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*. 1989;264(14):8171-8.
  134. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1988;10(4):128-38.
  135. Ramirez MT, Zhao XL, Schulman H, Brown JH. The nuclear deltaB isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(49):31203-8.
  136. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and Expression of  $\delta$ -Isoforms of the Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res*. 1999;84(6):713-21.
  137. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res*. 2005;97(12):1314-22.
  138. Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res*. 2006;99(4):398-406.
  139. Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skardal K, Wisloff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM,

- Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res*. 2012;110(11):1474-83.
140. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SK, Maier LS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2(6):664-75.
141. Lakatta EG. Cyclic Variation of Intracellular Calcium: A Critical Factor for Cardiac Pacemaker Cell Dominance. *Circulation Research*. 2003;92(3):45e-50.
142. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak-load relationship. *Circ Res*. 2002;91(7):594-600.
143. Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, Verheyen F, Verheule S, Schmitz W, Ravens U, Nattel S, Allessie MA, Dobrev D, Schotten U. Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(3):385-94.
144. Lenaerts I, Bito V, Heinzel FR, Driesen RB, Holemans P, D'Hooge J, Heidebuchel H, Sipido KR, Willems R. Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between  $\text{Ca}^{2+}$  influx and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ Res*. 2009;105(9):876-85.
145. Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J. Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38593-600.
146. Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J*. 2004;377(Pt 2):357-66.
147. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte  $\text{Ca}^{2+}$  handling: reduced SR  $\text{Ca}^{2+}$  load and activated SR  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Circ Res*. 2003;92(8):904-11.
148. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit

- cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006;98(2):235-44.
149. Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN. Regulation of the Transient Outward  $K^+$  Current by  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinases II in Human Atrial Myocytes. *Circ Res.* 1999;85(9):810-9.
150. Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Müller FU, Schmitz W, Schotten U, Anderson ME, Valderrábano M, Dobrev D, Wehrens XHT. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest.* 2009.
151. El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, Dobrev D. Molecular determinants of altered  $Ca^{2+}$  handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 2006;114(7):670-80.
152. Purohit A, Rokita AG, Guan X, Chen B, Koval OM, Voigt N, Neef S, Sowa T, Gao Z, Luczak ED, Stefansdottir H, Behunin AC, Li N, El-Accaoui RN, Yang B, Swaminathan PD, Weiss RM, Wehrens XH, Song LS, Dobrev D, Maier LS, Anderson ME. Oxidized  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation.* 2013;128(16):1748-57.
153. Anderson ME. Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: moving beyond an ion channel-centric focus. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):657-66.
154. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2002;106(10):1288-93.
155. Christ T, Boknik P, Wohrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D. L-type  $Ca^{2+}$  current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation.* 2004;110(17):2651-7.
156. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schondube FA, Hasenfuss G, Maier LS. CaMKII-dependent diastolic SR  $Ca^{2+}$  leak and elevated diastolic  $Ca^{2+}$  levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res.* 2010;106(6):1134-44.
157. Song Y, Shryock JC, Belardinelli L. An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes.

- Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294(5):H2031-9.
158. Hirose M, Laurita KR. Calcium-mediated triggered activity is an underlying cellular mechanism of ectopy originating from the pulmonary vein in dogs. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292(4):H1861-7.
159. Plank DM, Yatani A, Ritsu H, Witt S, Glascock B, Lalli MJ, Periasamy M, Fiset C, Benkusky N, Valdivia HH, Sussman MA. Calcium dynamics in the failing heart: restoration by beta-adrenergic receptor blockade. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(1):H305-15.
160. Reiken S, Wehrens XH, Vest JA, Barbone A, Klotz S, Mancini D, Burkhoff D, Marks AR. Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. Circulation. 2003;107(19):2459-66.
161. Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Wang A, Smith CD, Xie C, Chen W, Zhang J, Tian X, Jones PP, Zhong X, Guo A, Chen H, Zhang L, Zhu W, Yang D, Li X, Chen J, Gillis AM, Duff HJ, Cheng H, Feldman AM, Song LS, Fill M, Back TG, Chen SR. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced  $Ca^{2+}$  release. Nat Med. 2011;17(8):1003-9.
162. Hilliard FA, Steele DS, Laver D, Yang Z, Le Marchand SJ, Chopra N, Piston DW, Huke S, Knollmann BC. Flecainide inhibits arrhythmogenic  $Ca^{2+}$  waves by open state block of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels and reduction of  $Ca^{2+}$  spark mass. J Mol Cell Cardiol. 2010;48(2):293-301.
163. Voigt N, Rozmaritsa N, Trausch A, Zimniak T, Christ T, Wettwer E, Matschke K, Dobrev D, Ravens U. Inhibition of  $IK_{ACh}$  current may contribute to clinical efficacy of class I and class III antiarrhythmic drugs in patients with atrial fibrillation. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2010;381(3):251-9.
164. Lakatta EG, Vinogradova TM, Maltsev VA. The missing link in the mystery of normal automaticity of cardiac pacemaker cells. Ann N Y Acad Sci. 2008;1123:41-57.

## 7 Anhang

### 7.1 Im Rahmen dieser Dissertation verwendete Lösungen

| Lösung  | Ion / Substanz     | Konzentration |        |  |
|---|--------------------|---------------|--------|--|
| <b>St. Thomas<br/>Hospital<br/>Kardioplegie</b> | NaCl               | 110           | mmol/L |  |
|   | KCl                | 16            | mmol/L |  |
|   | MgCl <sub>2</sub>  | 16            | mmol/L | gelöst in ddH <sub>2</sub> O;<br>pH 7,4 mit NaOH bei 4°C |
|   | NaHCO <sub>3</sub> | 10            | mmol/L |  |
|   | Glucose            | 11            | mmol/L |  |
|   | CaCl <sub>2</sub>  | 1,2           | mmol/L |  |

Tabelle 7.1: St. Thomas Hospital Kardioplegie.

| Lösung  | Ion / Substanz                        |  | Konzentration |        |   |
|---|---------------------------------------|--|---------------|--------|---|
| <b>Ca<sup>2+</sup>-freie<br/>Isolutionslösung</b> | NaCl                                  |  | 88            | mmol/L |   |
|   | Sucrose                               |  | 88            | mmol/L |   |
|   | KCl                                   |  | 5,4           | mmol/L |   |
|   | NaHCO <sub>3</sub>                    |  | 4             | mmol/L |   |
|   | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |  | 0,3           | mmol/L | gelöst in ddH <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit<br>NaOH bei 36°C     |
|   | MgCl <sub>2</sub>                     |  | 1,1           | mmol/L |   |
|   | HEPES                                 |  | 10            | mmol/L |   |
|   | Taurin                                |  | 20            | mmol/L |   |
|   | Glucose                               |  | 10            | mmol/L |   |
|   | Na <sup>+</sup> -Pyruvat              |  | 5             | mmol/L |   |
| <b>Enzymlösung 1</b>                              | Collagenase<br>Wort-<br>hington Typ 2 |  | 2             | mg/mL  | gelöst in Isolutionslösung;<br>pH 7,4 bei 36°C                |
|   | Proteinase<br>Sigma<br>Typ XXIV       |  | 50            | µg/mL  |   |
| <b>Enzymlösung 2</b>                              | Collagenase<br>Wort-<br>hington Typ 2 |  | 1,8           | mg/mL  | gelöst in Isolutionslösung;<br>pH 7,4 bei 36°C                |
|   | Proteinase<br>Sigma<br>Typ XXIV       |  | 50            | µg/mL  |   |
| <b>KB-Medium</b>                                  | Taurin                                |  | 10            | mmol/L |   |
|   | Glutaminsäure                         |  | 70            | mmol/L |   |
|   | KCl                                   |  | 25            | mmol/L | gelöst in ddH <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit<br>KOH bei 23°C (RT) |
|   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       |  | 10            | mmol/L |   |
|   | Dextrose                              |  | 22            | mmol/L |   |
|   | EGTA                                  |  | 0,5           | mmol/L |   |

Tabelle 7.2: Zur Isolation von humanen Herzmuskelzellen benötigte Lösungen.

| Lösung                            | Ion / Substanz     | Konzentration |        |   |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|--------|---|
| <b>KN-92 Stock</b><br>(10 mmol/L) | KN-92              |               |        | 1 mg KN-92 (555,0 g/mol) in<br>180,2 µL DMSO lösen und<br>bei -20°C lichtgeschützt la-<br>gern                |
|                                   | DMSO               |               |        |   |
| <b>KN-93 Stock</b><br>(10 mmol/L) | KN-93              |               |        | 1 mg KN-93 (559,0 g/mol) in<br>166,94 µL ddH <sub>2</sub> O lösen und<br>bei -20°C lichtgeschützt la-<br>gern |
|                                   | ddH <sub>2</sub> O |               |        |   |
| <b>KN-92 Lösung</b><br>(1 µmol/L) | KN-92 Stock        | 10            | mmol/L | 10 µL der Stocklösung in 100<br>µL DMSO verdünnen und bei<br>-20°C lichtgeschützt lagern                      |
|                                   | DMSO               |               |        |   |
| <b>KN-93 Lösung</b><br>(1 µmol/L) | KN-93 Stock        | 10            | mmol/L | 10 µL der Stocklösung in 100<br>µL ddH <sub>2</sub> O verdünnen und bei<br>-20°C lichtgeschützt lagern        |
|                                   | ddH <sub>2</sub> O |               |        |   |

Tabelle 7.3: CaMKII-Inhibitor KN-93 und sein inaktives Analogon KN-92.



| Lösung   | Ion / Substanz                       | Konzentration |        |  |
|--|--------------------------------------|---------------|--------|--|
| <b>Fura-2 AM Stocklösung</b><br>(1 mmol/L)                           | Fura-2 AM                            |               |        | 1 mg Fura-2 AM (1001,86 g/mol) in 998,1 µL DMSO lösen und bei -20°C lichtgeschützt lagern  |
|  | DMSO (Fluka 41640)                   |               |        |  |
| <b>Fura-2 AM Farbstofflösung</b><br><b>10 µmol/L)</b>                | Fura-2 AM Stocklösung                | 1             | mmol/L | 50 µL der Fura-2 AM Stocklösung und 5 µL Pluronic in 5 mL Messlösung lösen; als 200 µL Aliquots lichtgeschützt bei -20°C lagern                      |
|  | Pluronic-Lösung                      | 200           | mg/mL  |  |
|  | Messlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> | 1             |        |  |
| <b>Fura-2 AM Farbstofflösung (10 µmol/L) mit KN-92</b><br>(1 µmol/L) | Fura-2 AM Stocklösung                | 1             | mmol/L | Farbstofflösung wie oben beschrieben herstellen und zusätzlich 5 µL KN-92 bzw. KN-93 hinzufügen; als 200 µL Aliquots lichtgeschützt bei -20°C lagern |
|  | Pluronic-Lösung                      | 200           | mg/mL  |  |
|  | Messlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> | 1             |        |  |
|  | KN-92                                | 1             | mmol/L |  |
| <b>Fura-2 AM Farbstofflösung (10 µmol/L) mit KN-93</b><br>(1 µmol/L) | Fura-2 AM Stocklösung                | 1             | mmol/L |  |
|  | Pluronic-Lösung                      | 200           | mg/mL  |  |
|  | Messlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> | 1             |        |  |
|  | KN-93                                | 1             | mmol/L |  |

**Tabelle 7.4: Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM.** Zunächst wurde eine Fura-2 AM-Stocklösung (1 mmol/L), dann die Farbstofflösung (10 µmol/L) für die Messungen hergestellt.

| Lösung  | Ion / Substanz                       | Konzentration   |   |
|---|--------------------------------------|---|---|
| <b>Fluo-3 AM Stock (1 mmol/L)</b>                                 | Fluo-3 AM                            | 1 mg Fluo-3 AM (1129,86 g/mol) in 885 µL DMSO lösen und bei -20°C lichtgeschützt lagern |   |
|   | DMSO (Fluka 41640)                   |   |   |
| <b>Fluo-3 AM Farbstofflösung (10 µmol/L)</b>                      | Fluo-3 AM Stocklösung                | 1 mmol/L  | 50 µL der Fluo-3 AM Stocklösung und 5 µL Pluronic in 5 mL Messlösung lösen; als 200 µL Aliquots lichtgeschützt bei -20°C lagern                 |
|   | Pluronic-Lösung                      | 200 mg/mL   |   |
|   | Messlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> |   |   |
| <b>Fluo-3 AM Farbstofflösung (10 µmol/L) mit KN-92 (1 µmol/L)</b> | Fluo-3 AM Stocklösung                | 1 mmol/L  | Farbstofflösung wie oben beschrieben herstellen und zusätzlich KN-92 bzw. KN-93 hinzufügen; als 200 µL Aliquots lichtgeschützt bei -20°C lagern |
|   | Pluronic-Lösung                      | 200 mg/mL   |   |
|   | Messlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> |   |   |
|   | KN-92-Lösung                         | 1 mmol/L  |   |
| <b>Fluo-3 AM Farbstofflösung (10 µmol/L) mit KN-93 (1 µmol/L)</b> | Fluo-3 AM Stocklösung                | 1 mmol/L  |   |
|   | Pluronic-Lösung                      | 200 mg/mL   |   |
|   | Messlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> |   |   |
|   | KN-93-Lösung                         | 1 mmol/L  |   |

**Tabelle 7.5: Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM.** Zunächst wurde eine Fluo-3 AM-Stocklösung (1mmol/L), dann die Farbstofflösung (10 µmol/L) für die Messungen hergestellt.

| Lösung   | Ion / Substanz                   | Konzentration |        |   |
|--|----------------------------------|---------------|--------|---|
| <b>Messlösung ohne <math>\text{Ca}^{2+}</math></b> | NaCl                             | 136           | mmol/L | gelöst in ddH <sub>2</sub> O; pH 7,4,<br>mit NaOH bei 23°C (RT) |
|  | KCl                              | 4             | mmol/L |   |
|  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,33          | mmol/L |   |
|  | NaHCO <sub>3</sub>               | 4             | mmol/L |   |
|  | MgCl <sub>2</sub>                | 1,6           | mmol/L |   |
|  | HEPES                            | 10            | mmol/L |   |
|  | Glucose                          | 5             | mmol/L |   |
| <b>Messlösung mit <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>  | CaCl <sub>2</sub>                | 2             | mmol/L | gelöst in Messlösung<br>ohne $\text{Ca}^{2+}$                   |
| <b>Messlösung mit KN-92</b>                        | KN-92                            | 1             | µmol/L | gelöst in Messlösung<br>mit $\text{Ca}^{2+}$                    |
| <b>Messlösung mit KN-93</b>                        | KN-93                            | 1             | µmol/L | gelöst in Messlösung<br>mit $\text{Ca}^{2+}$                    |
| <b>Messlösung mit Tetracain</b>                    | Tetracain                        | 1             | mmol/L | gelöst in Messlösung<br>mit $\text{Ca}^{2+}$                    |
| <b>Messlösung mit Koffein</b>                      | Koffein                          | 10            | mmol/L | gelöst in Messlösung<br>mit $\text{Ca}^{2+}$                    |

Tabelle 7.6: Messlösungen für Epifluoreszenz- und konfokale Laserfluoreszenzmessungen.

| Lösung  | Ion / Substanz    | Konzentration |                   |   |
|---|-------------------|---------------|-------------------|---|
| <b>Kalibrierungs-<br/>lösung für <math>R_{\min}</math></b>  | Ionomycin         | 5             | $\mu\text{mol/L}$ |   |
|   | Nigericin         | 1,34          | $\mu\text{mol/L}$ |   |
|   | NaCl              | 10            | mmol/L            | gelöst in ddH <sub>2</sub> O;<br>pH 7,4, mit KOH<br>bei 23°C (RT) |
|   | KCl               | 125           | mmol/L            |   |
|   | HEPES             | 25            | mmol/L            |   |
|   | MgSO <sub>4</sub> | 1             | mmol/L            |   |
|   | EGTA              | 5             | mmol/L            |   |
| <b>Kalibrierungs-lö-<br/>sung für <math>R_{\max}</math></b> | Ionomycin         | 5             | $\mu\text{mol/L}$ |   |
|   | Nigericin         | 1,34          | $\mu\text{mol/L}$ |   |
|   | NaCl              | 10            | mmol/L            | gelöst in ddH <sub>2</sub> O;<br>pH 7,4, mit KOH<br>bei 23°C (RT) |
|   | KCl               | 125           | mmol/L            |   |
|   | HEPES             | 25            | mmol/L            |   |
|   | MgSO <sub>4</sub> | 1             | mmol/L            |   |
|   | CaCl <sub>2</sub> | 5             | mmol/L            |   |

Tabelle 7.7: Kalibrierungslösung für ratiometrische Epifluoreszenzmessungen mit Fura-2.

| Lösung                 | Ion / Substanz | Konzentration |        |   |
|------------------------|----------------|---------------|--------|---|
| <b>Collagen-Lösung</b> | Collagen Typ 1 | 1             | mg/mL  | 1 Teil Collagen mit 1 Teil              |
|                        | Polylysin      | 0,5           | mg/mL  | Polylysin und 3 Teilen                  |
|                        | Essigsäure     | 17            | mmol/L | Essigsäure mischen,<br>bei -20°C lagern |

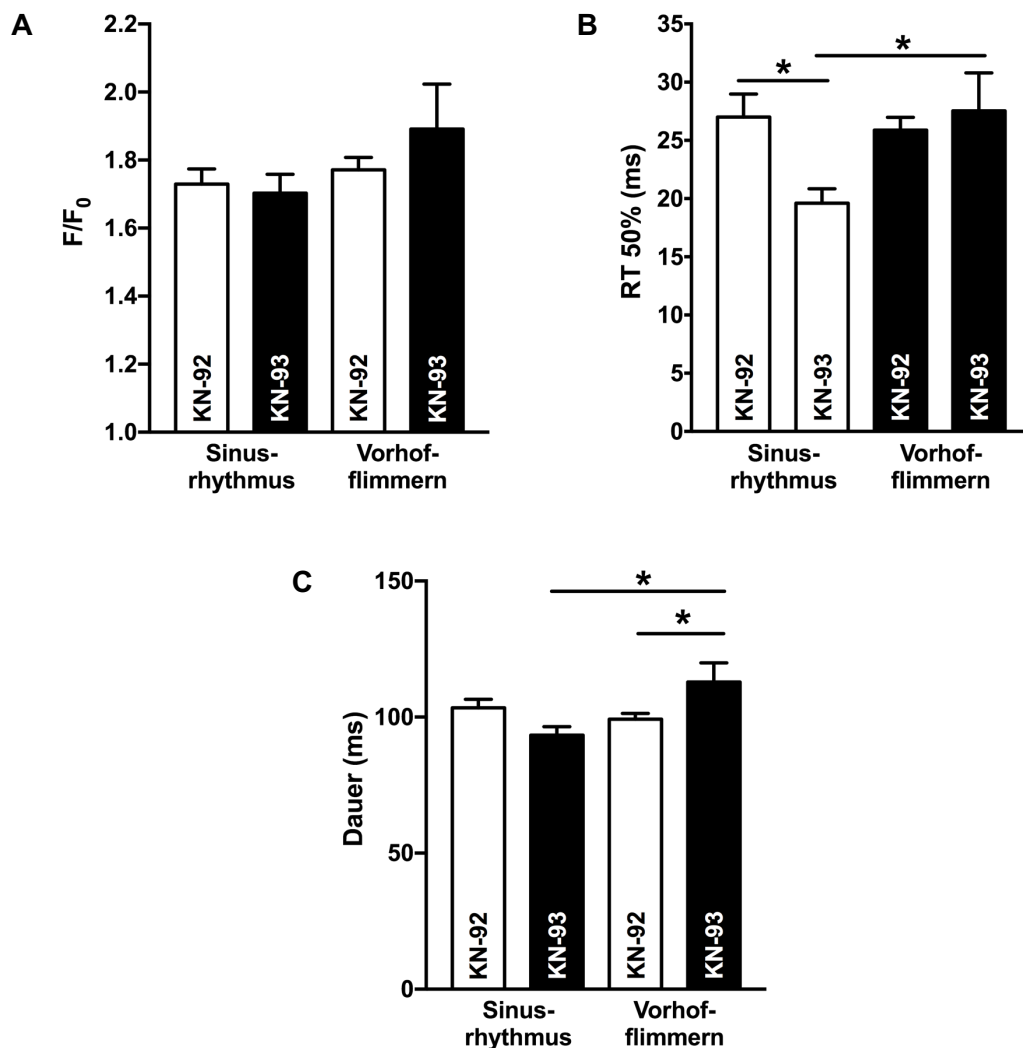
Tabelle 7.8: Collagen-Lösung zur Zellfixierung auf den Messkammern.

## 7.2 In dieser Dissertation verwendete spezielle Substanzen

| Substanz   | Hersteller        |                   |
|--|-------------------|-------------------|
| <b>KN-93</b>                                       | Merck Calbiochem® | Cat.No. 422711    |
| <b>KN-92</b>                                       | Merck Calbiochem® | Cat.No. 422709    |
| <b>Collagenase Worthington<br/>Typ 2, 290 U/mg</b> | Worthington       | Lot-Nr: X8A10238B |
| <b>Proteinase Sigma<br/>Typ XXIV, 9 U/mg</b>       | Sigma             | Produkt-Nr. P8038 |
| <b>Collagen Typ 1 (Ratte)</b>                      | BD Biosciences    | Cat.No. 354236    |
| <b>Fura-2 AM</b>                                   | Molecular Probes™ | Cat.No. F1201     |
| <b>Fluo-3 AM</b>                                   | MoBiTec®          | Bestellnr. 01241  |

Tabelle 7.9: In dieser Dissertation verwendete spezielle Substanzen.

## 7.3 Ergänzende Abbildungen zu Kap. 3.3.3



**Abbildung 7.1: Weitere  $Ca^{2+}$ -Spark-Parameter.** **A:** Fluoreszenz-Amplitude als  $F/F_0$ . **B:** Zeit bis zum 50%igen Abfall (RT 50%) der Fluoreszenz eines Sparks. **C:** Gesamtdauer eines  $Ca^{2+}$ -Sparks in ms (Vorhofflimmern/KN-92, n=96 Sparks aus 19 Zellen; Vorhofflimmern/KN-93, n=21 Sparks aus 11 Zellen; Sinusrhythmus/KN-92, n=72 Sparks aus 32 Zellen; Sinusrhythmus/KN-93, n=28 Sparks aus 19 Zellen; \* $P < 0,05$ ).

---

# Originalpublikation

Die vorliegende Dissertation war Grundlage für die folgende Publikation:

**CaMKII-dependent diastolic SR Ca<sup>2+</sup> leak and elevated diastolic Ca<sup>2+</sup> levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation.**

Stefan Neef<sup>1\*</sup>, Nataliya Dybkova<sup>1\*</sup>, Samuel Sossalla<sup>1\*</sup>, Katharina R. Ort<sup>1</sup>, Nina Fluschnik<sup>1</sup>, Kay Neumann<sup>1</sup>, Ralf Seipelt<sup>2</sup>, Friedrich A. Schöndube<sup>2</sup>, Gerd Hasenfuß<sup>1</sup>, Lars S. Maier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Cardiology and Pneumology, Georg-August-University, Göttingen, Germany

<sup>2</sup> Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Georg-August-University, Göttingen, Germany

\* contributed equally

publiziert am 2. April 2010 in Circulation Research, 106:1134-1144;

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.203836

online publiziert am 7. Januar 2010

Impact Factor: 13,965

Zitierungen: 277 (Stand 10.01.2019)

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lars Maier, der mich für die experimentelle kardiologische Forschung, insbesondere auf dem Gebiet der CaMKII und ihrer Rolle bei Vorhofflimmern, begeistern konnte.

Zu großem Dank bin ich vor allem auch dem wissenschaftlichen Betreuer meiner Dissertation, Dr. med. Stefan Neef, verpflichtet. Sein unermüdlicher und engagierter Einsatz und seine Unterstützung waren unverzichtbar bei der Durchführung und Auswertung meiner Experimente sowie bei der Verschriftlichung ihrer Ergebnisse.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova für die Herstellung der Western Blots und ihre gemeinsame Auswertung bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine heutigen Kollegen der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen für die Aufklärung der Patienten und die Entnahme der Gewebeproben und an die Patienten selbst für die Gewebespenden.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den technischen Assistenten Timo Schulte, Felicia Radtke und Thomas Sowa bedanken. Ohne ihre Fähigkeiten in der Isolation von humanen Kardiomyozyten und ihren technischen und mentalen Support wären die hier beschriebenen Experimente nicht möglich gewesen. Ebenso danke ich meinen Mitdoktoranden und -doktorandinnen und den anderen „Postdocs“ in unserer Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung, die Vermittlung der experimentellen Fähigkeiten, die nette und konstruktive Atmosphäre und die angeregten wissenschaftlichen Diskussionen.

Außerhalb des Labors geht mein herzlichster Dank an meine Familie und Freunde, die mich durch die gesamte Zeit begleitet und mir immer den Rücken gestärkt haben.



---

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Göttingen, den 10.01.2019